

# **Detección de películas nanométricas por microscopia de ángulo de Brewster**

Dr Joan Torrent, Departamento de Ingeniería Química

Escuela de Óptica y Optometría de Terrassa, Universitat Politècnica de Catalunya

## **Resumen**

La microscopia de ángulo de Brewster (BAM) es una técnica óptica que permite la observación y detección de películas a partir de unos pocos nanómetros de grosor, siendo muy útil para caracterizar películas orgánicas sobre agua o un medio acuoso, como es el caso de los lípidos (ácidos grasos, fosfolípidos, acilglicerolos) y otros compuestos especialmente anfifílicos, y que por extensión puede aplicarse a la capa lipídica de la película lagrimal. Si bien la resolución vertical del BAM es en la escala nanométrica, sin embargo la resolución lateral solo llega a la escala micrométrica.

## **Abstract**

The Brewster Angle Microscopy (BAM) is an optical technique allowing the observation and detection of films of a few nanometers thick, being very useful for the characterization of oil films on water or an aqueous environment, as is the case of lipids (fatty acids, phospholipids, acylglycerols) and other compounds, and for extension can be applied to the lipid layer of the tear film. Although the vertical resolution of BAM is in the nanometric scale, the lateral resolution is only in the micrometric scale.

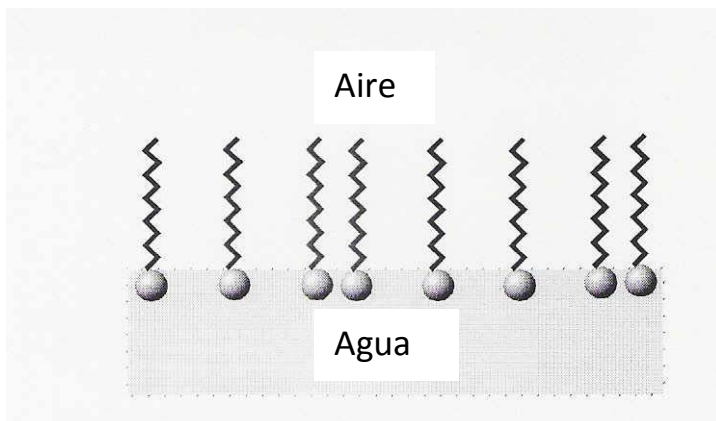
## **Palabras clave**

Microscopio de ángulo de Brewster (BAM), monocapa, multicapa, interfase aire/agua, lípido, sustancia anfifílica.

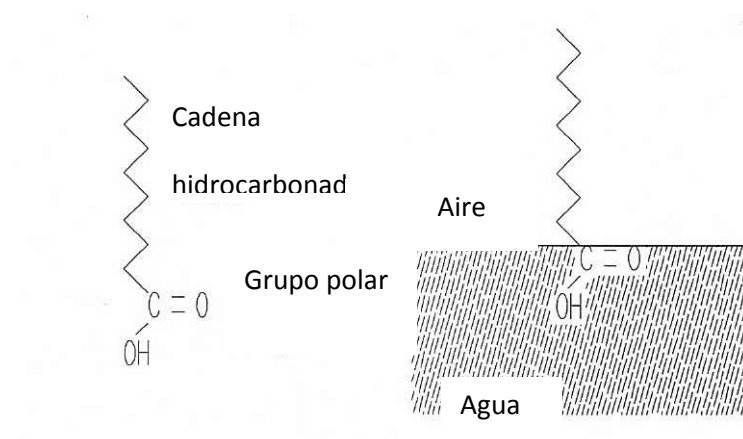
## Introducción

La microscopía de ángulo de Brewster (o BAM, de las siglas inglesas) es una técnica óptica que permite la observación de películas formadas sobre la superficie de un líquido o de un sólido, aún siendo de dimensiones nanométricas. Su uso es frecuente en el estudio de las películas de Langmuir, formadas por la extensión de las moléculas de una sustancia orgánica sobre agua.

Tal como se muestra en la Figura 1a, las moléculas de una sustancia anfifílica insoluble en agua (Figura 1b) se extienden y disponen en la superficie del líquido, generalmente agua, formando una capa molecular o monocapa. La parte hidrofóbica, que suele ser la cadena hidrocarbonada, se orienta hacia el aire, mientras que la parte hidrofílica, que suele ser el grupo polar o con carga, se orienta hacia el agua. Puesto que el grosor de la película es del orden de la longitud de la molécula, se obtiene una película de grosor nanométrico.



**Figura 1a.** Formación de una monocapa de Langmuir en la interfase aire-agua.

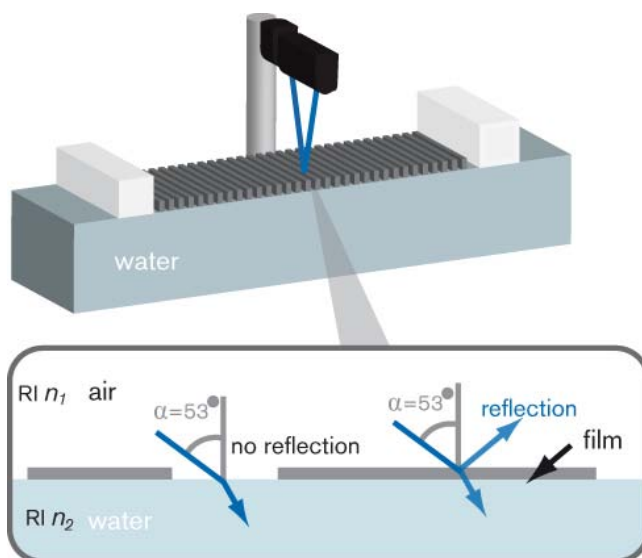


**Figura 1b.** Estructura molecular de una sustancia anfifílica y orientación en la interfase aire-agua.

Los fundamentos del BAM se explican más ampliamente en el anexo 1, y se muestran en la Figura 1c. El ángulo de Brewster está relacionado con los índices de refracción de los dos medios ópticos mediante la relación:

$$\tan \alpha = n_{\text{substrato}} / n_{\text{aire}}$$

Para la interface aire/agua, este ángulo toma el valor de  $53^\circ$  que es cuando no se produce reflexión. Si se forma una película sobre agua, entonces la relación anterior deja de cumplirse para este ángulo y aparece una reflexión que puede detectarse y dar lugar a una imagen de la película.



**Figura 1c.** Principio de funcionamiento de la microscopía de ángulo de Brewster (BAM).

La técnica puede aplicarse a todo tipo de sustancias que se extiendan sobre agua [1-4], e incluso al estudio de la película lacrimal y más en concreto de la capa lipídica [5-7].

En este report se aplica el microscopio de ángulo de Brewster para estudiar la formación de películas en la interface aire/agua de diferentes sustancias orgánicas o biológicas, así como de alguna de sus mezclas. En la mayoría de los sistemas presentados, se ha observado cómo cambia la estructura de la película con la compresión a la que se la somete (presión superficial). También se recogen referencias bibliográficas de trabajos que utilizan esta técnica.

## Resultados Experimentales

En este apartado se presentan las imágenes obtenidas con BAM de diferentes sistemas: agua ultrapura y agua contaminada, y de películas de diferentes sustancias (MPG, AA, DPPC, compuestos macrocíclicos) formadas sobre agua. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio comercial “MicroBAM de NIMA-Nanofilm” (Figura 2), el cual utiliza luz láser de 659 nm de longitud de onda, un rayo colimado de 6 mm de diámetro, con una potencia de 30 mW y tiene una resolución lateral de 8 micras. Las imágenes de BAM muestran un área de 3,6 mm x 4,1 mm.

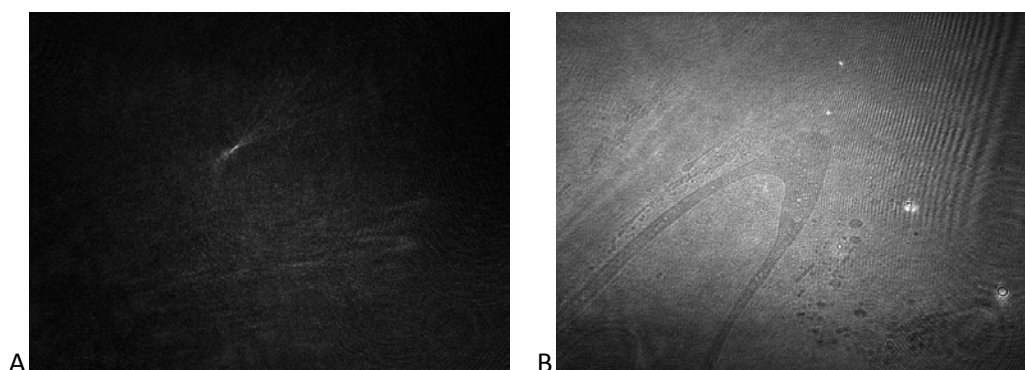


**Figura 2.** Microscopio de ángulo de Brewster comercial.

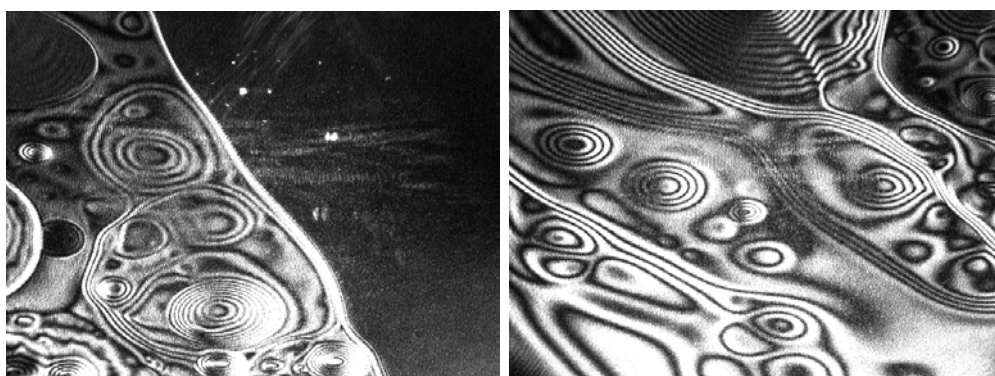
La Figura 3A muestra una imagen de BAM de agua ultrapura. Debido a la eliminación de la reflexión, tenemos una imagen oscura. En la Figura 3B se muestra una imagen de agua contaminada con restos orgánicos, los cuales forman una película sobre el agua que se hace visible al microscopio. El BAM es una buena técnica para determinar si el agua presenta restos oleosos ya que éstos se hacen muy visibles, y por lo tanto puede utilizarse para el control de la calidad del agua en laboratorios de investigación, para contaminaciones medioambientales e incluso del agua de abastecimiento para consumo. La Figura 4 muestra imágenes



espectaculares de películas formadas al esparcir un hidrocarburo tipo gasóleo sobre la superficie del agua.

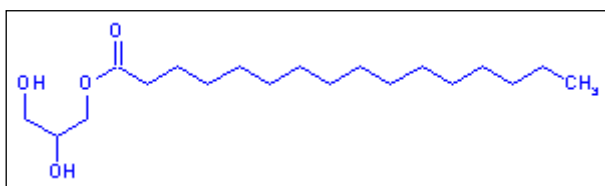


**Figura 3.** Imágenes de BAM para: A) agua ultrapura; B) agua contaminada con restos orgánicos.



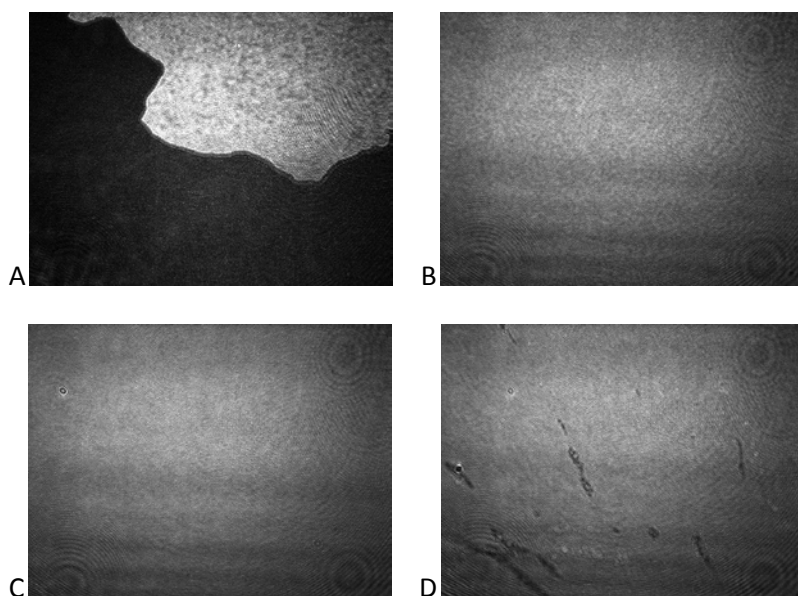
**Figura 4.** Imágenes de BAM de una película de un hidrocarburo sobre agua.

El monopalmitoilglicerol (Figura 5) es un derivado del glicerol con una cadena de ácido graso, el palmítico. Este compuesto forma monocapas en la interface aire-agua con la presencia de dominios que pueden observarse en las imágenes de BAM (Figura 6). Además dentro de estos dominios se observan zonas o subdominios con diferentes tonos o contrastes, debido a que en cada zona las moléculas presentan una organización u orientación diferente.



**Figura 5.** Estructura del monopalmitoilglicerol (MPG).



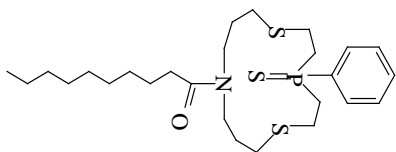


**Figura 8.** Imágenes de BAM de una monocapa de AA a las presiones de: A) 0 mN/m, B) 4 mN/m, C) 17 mN/m, D) colapso.

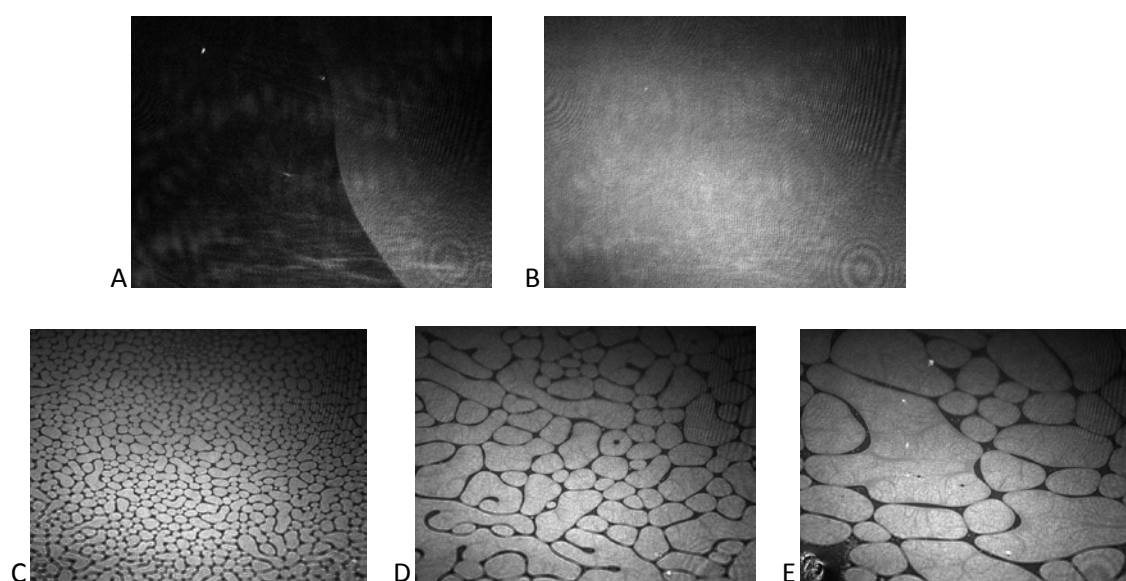
La Figura 7 muestra la estructura del ácido araquídico, AA, un ácido graso de cadena saturada y con 20 átomos de carbono. La Figura 8 presenta imágenes de BAM de una monocapa de AA durante el proceso de compresión en una cubeta con barreras móviles [2]. Cada imagen fue obtenida a la presión superficial indicada, pudiéndose observar como al comprimir se forma una película más compacta, la cual finalmente se rompe al llegar al colapso. En el anexo 3 se muestran más imágenes de BAM para el ácido araquídico.

En el anexo 6 se muestran también los resultados para la oleamida, que presenta un grupo amida en lugar de un ácido carboxílico como grupo funcional.

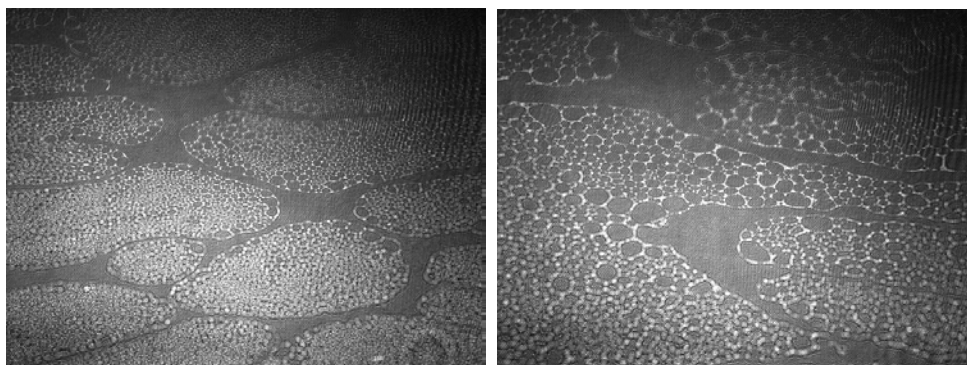
La Figura 9 muestra la estructura del compuesto tiomacrociclo, ThMC, y la Figura 10 las imágenes de BAM de una película de éste compuesto. Inicialmente el ThMC forma una monocapa que se va compactando (imágenes 10 A y B), pero al llegar a una cierta presión superficial se produce la formación de una multicapa, la cual continua cuando se la somete a una compresión elevada (imágenes 10 C y D). En las imágenes puede observarse la formación de unos dominios muy visibles que van creciendo por coalescencia al comprimir. Finalmente, en la Figura 10E puede verse como el proceso de coalescencia continua, incluso después de parar la compresión. En la Figura 11 se muestran imágenes curiosas de lo que le ocurre a la película durante el proceso de descompresión, observándose la formación de una especie de espuma. En el anexo 4 se muestran más imágenes de BAM para el ThMC.



**Figura 9.** Estructura del compuesto tiomacrociclo, ThMC.

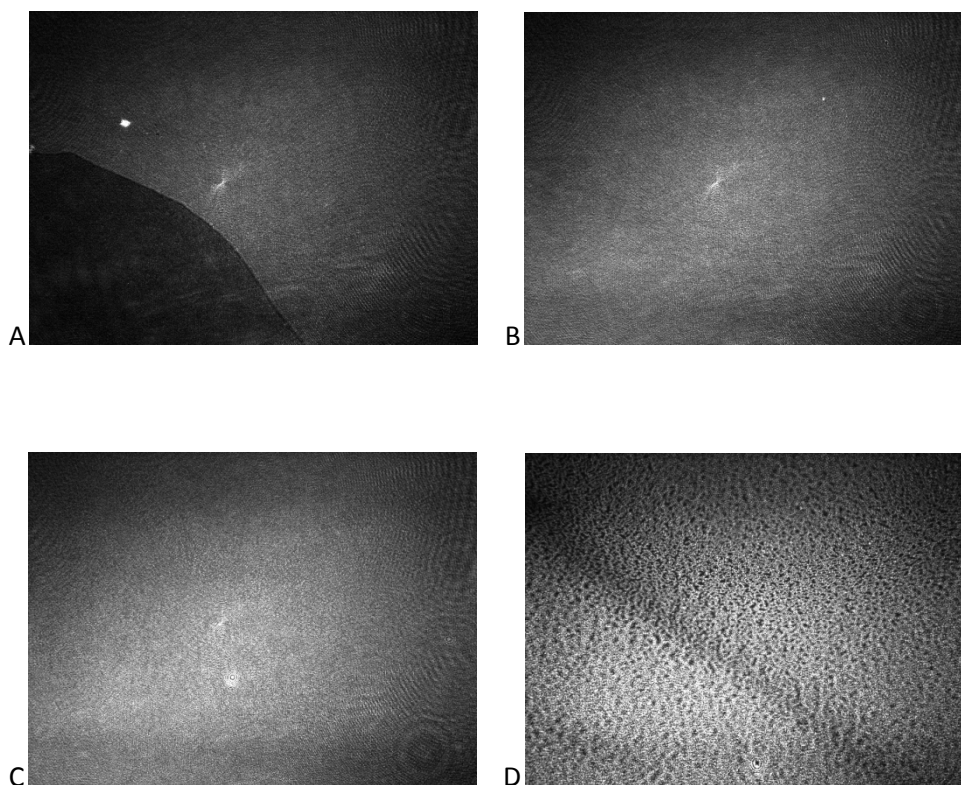


**Figura 10.** Imágenes de BAM de una película de ThMC a las presiones de: A) 0,2 mN/m, B) 7 mN/m, C) 13,6 mN/m, D) 13,9 mN/m. E) imagen después de D pasado un cierto tiempo.

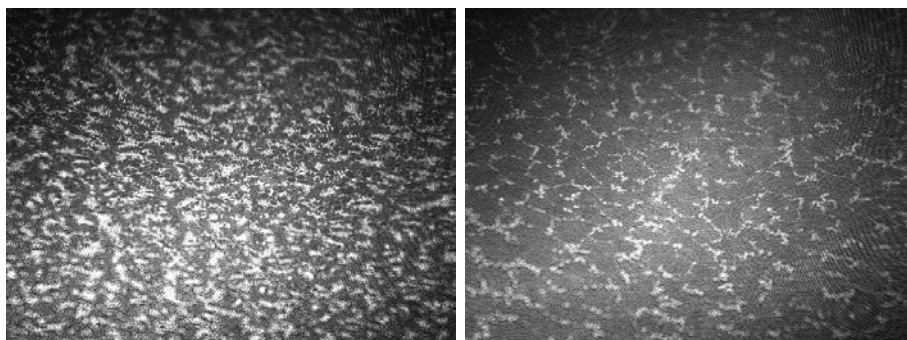


**Figura 11.** Imágenes de BAM de una monocapa de ThMC durante el proceso de descompresión que sigue al proceso mostrado en la Figura 10.

La Figura 12 corresponde a las imágenes de BAM obtenidas cuando los compuestos AA y ThMC se extienden juntos sobre agua para formar una película y son sometidos a compresión. Comparando las imágenes con las mostradas en las Figuras 8 y 10 pueden observarse diferencias debido a la presencia conjunta de ambos compuestos, especialmente en las imágenes 12 C y D donde puede verse claramente que la presencia de AA dificulta la formación de los dominios multicapa observados previamente para el compuesto ThMC. También pueden observarse diferencias en el proceso de descompresión (Figura 13) puesto que no se forma la espuma observada en la Figura 11, observándose más bien que la película se rompe a trozos desconexos.

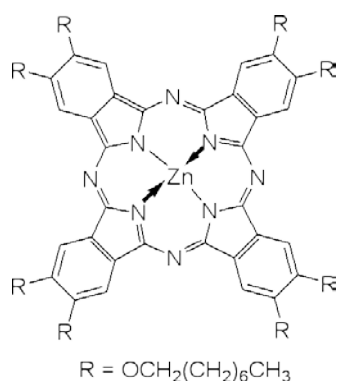


**Figura 12.** Imágenes de BAM de una película con una mezcla de AA y ThMC, a las presiones de: A) 0,2 mN/m, B) 6,8 mN/m, C) 13,4 mN/m, D) 14,4 mN/m.

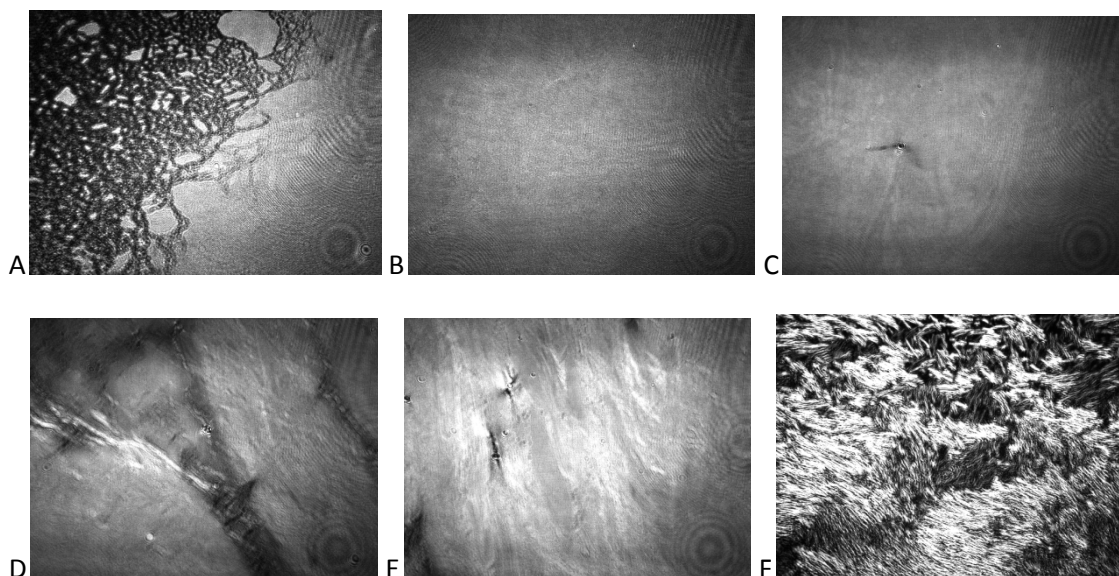


**Figura 13.** Imágenes de BAM de una película de AA y ThMC durante la descompresión que sigue al proceso mostrado en la Figura 12.

La Figura 14 muestra la estructura de un compuesto macrocíclico diferente, oxPcZn, correspondiente a la familia de las ftalocianinas, el cual presenta ocho grupos octiloxi unidos al anillo principal. Las ftalocianinas son compuestos sintéticos usados como colorantes, y en concreto la oxPcZn presenta un color verde. En la Figura 15 se presentan las imágenes de BAM de una película formada con este compuesto durante el proceso de compresión. Inicialmente se forma una monocapa que se va compactando, hasta que aparece la formación de una multicapa (Imagen 15 D) y el colapso (Imagen 15 E). En el proceso de descompresión (Imagen 15F) puede observarse la agregación que ha tenido lugar durante la compresión. La agregación es un fenómeno típico entre las moléculas de ftalocianina.

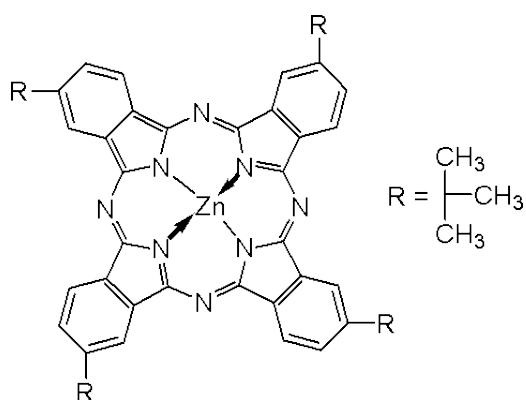


**Figura 14.** Estructura del compuesto macrocíclico de ftalocianina, oxPcZn.



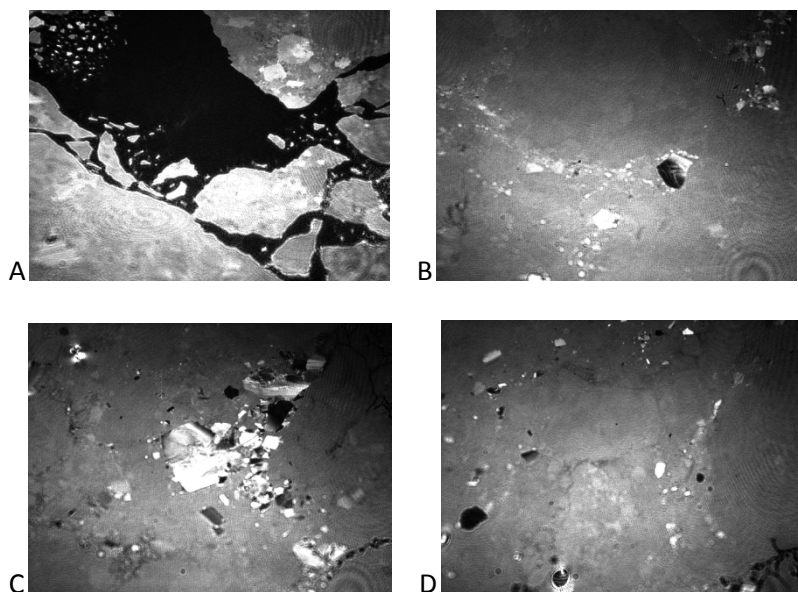
**Figura 15.** Imágenes de BAM de una película de oxPcZn a las presiones de: A) 0,1 mN/m, B) 0,7 mN/m, C) 7,5 mN/m, D) 22 mN/m, E) 28 mN/m. F) imagen durante la descompresión que sigue al proceso anterior.

La Figura 16 muestra la estructura de otro compuesto macrocíclico diferente, t-buPcZn, correspondiente a la familia de las ftalocianinas. En concreto la t-buPcZn presenta un color azul y en su estructura hay cuatro grupos tert-butil unidos al anillo principal. En la Figura 17 se presentan las imágenes de BAM de una película formada con este compuesto durante el proceso de compresión, donde puede observarse la agregación inicial y el carácter quebradizo de estas películas debido a la rigidez que presentan. En el anexo 5 se muestran más imágenes de BAM para el t-buPcZn.



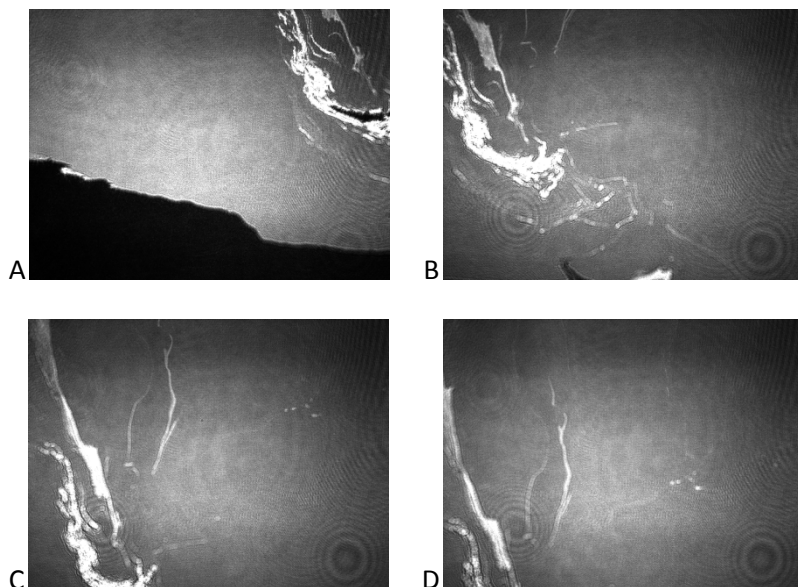
**Figura 16.** Estructura del compuesto macrocíclico de ftalocianina, t-buPcZn.





**Figura 17.** Imágenes de BAM de una película de t-buPcZn a las presiones de: A) 0 mN/m, B) 2,2 MN/m, C) 15 mN/m, D) 29 mN/m.

La Figura 18 muestra las imágenes de BAM cuando se mezclan AA con t-buPcZn. Puede observarse que aunque la película no es del todo uniforme, el carácter quebradizo de las películas de t-buPcZn desaparece debido a la presencia del AA, y que pueden alcanzarse presiones superficiales más elevadas.

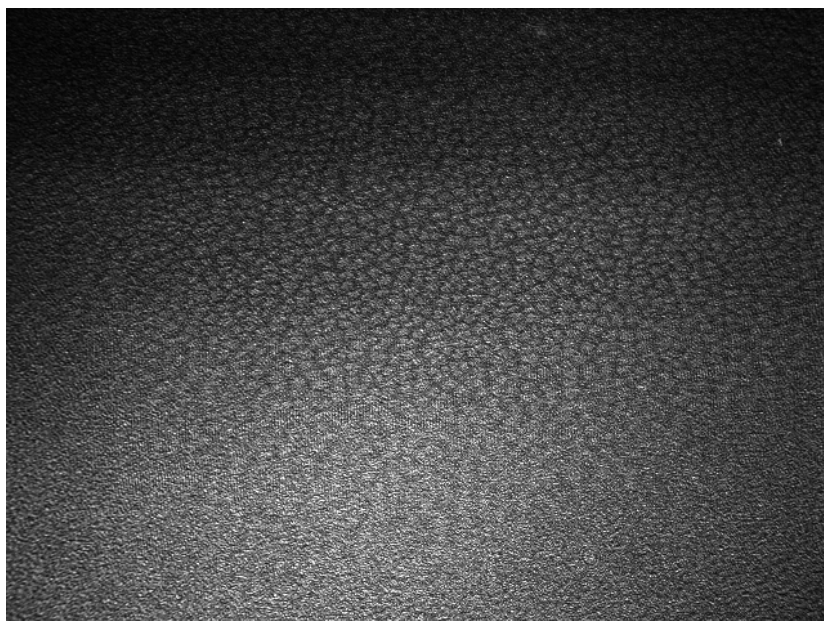


**Figura 18.** Imágenes de BAM de una película de AA y t-buPcZn a las presiones de: A) 0,2 mN/m, B) 11,5 mN/m, C) 30 mN/m, D) 40,3 mN/m.

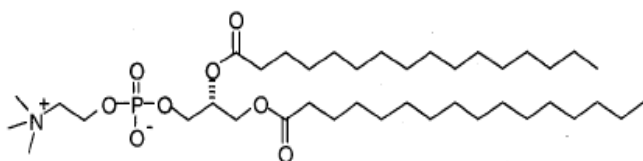


En el anexo 7 se muestran también imágenes de otra familia de compuestos macrocíclicos, que son los calixarenos.

Finalmente, la Figura 19 muestra una imagen de BAM de los dominios que se forman en el cambio de fase que presenta el DPPC (Figura 20) cuando se comprime. Dichos dominios son pequeños y están casi en el límite de resolución del microscopio utilizado.



**Figura 19.** Imagen de BAM de una película de DPPC en el cambio de fase.



**Figura 20.** Estructura del DPPC.

Tal como se ha indicado, la técnica puede aplicarse al estudio de la película lacrimal y más en concreto de la capa lipídica. A continuación se muestran imágenes de BAM de la capa lipídica Meibomiana (MGS) publicadas en las referencias [6] y [7], mientras que otras del grupo del autor se publicaron en la referencia [5]. Otros trabajos que han utilizado la técnica BAM se recogen en el anexo a la bibliografía.



Fig. 8. Morphology of the MGS film.  $p = 0.5 \text{ mN/m}$ ,  $T = 18^\circ \text{ C}$ .

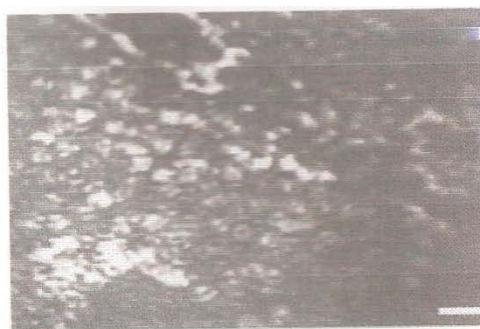


Fig. 9. Morphology of the MGS film under further compression.  $p = 5.0 \text{ mN/m}$ ,  $T = 18^\circ \text{ C}$ .



Fig. 10. Dense MGS film.  $p = 12 \text{ mN/m}$ ,  $T = 18^\circ \text{ C}$ .



Fig. 11. Coincidence of three phases of the MGS film.  $p < 0.5 \text{ mN/m}$ ,  $T = 28^\circ \text{ C}$ .



Fig. 12. Pattern of a drop of MGS during spreading.  $p < 0.5 \text{ mN/m}$ ,  $T = 28^\circ \text{ C}$ .

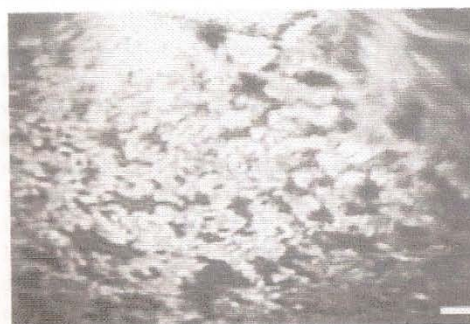
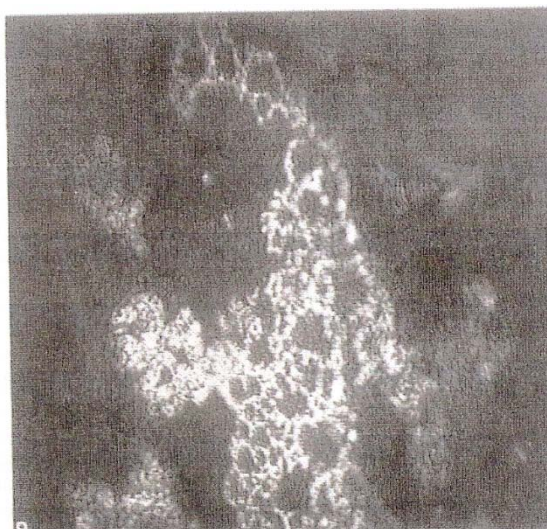


Fig. 13. Initial phase of spreading MGS.  $p < 0.5 \text{ mN/m}$ ,  $T = 28^\circ \text{ C}$ .

**Figura 21.** Imágenes de BAM de la capa lipídica Meibomiana (MGS: Meibomian gland secretion) a diferentes presiones superficiales.



**Figura 22.** Imagen BAM de la capa lipídica MGS en un paciente con meibomitis.

### **Consideraciones finales**

Un BAM con mayor resolución lateral, por ejemplo de 2 micras, permite observar con más detalles la estructura de la monocapa o película. Esto usualmente conlleva la observación de una zona más pequeña, por ejemplo del orden de 0,5 mm x 0,5 mm, pero una disminución en la intensidad de la luz captada, por lo que puede ser conveniente o necesario usar láseres más potentes. En el anexo 2 se recogen también imágenes de BAM publicadas en la bibliografía por diferentes autores.

### **Bibliografía**

- [1] Torrent J, Antó J. Ver y Oír enero-febrero 2006, pg 4-7.
- [2] Torrent J. Ver y Oír septiembre 2007, pg 476-479.
- [3] Petty MC. Langmuir-Blodgett films. Cambridge University Press, 1996.
- [4] Ulman A. An Introduction to Ultrathin Organic Films. Academic Press, 1990.
- [5] Gaus E, Seres C, Torrent J. Ver y Oír 4º trimestre 2009, pg 198-205.
- [6] Kaercher T, Hönig D, Möbius D. International Ophthalmology 17 (1993) 341-348.
- [7] Kaercher T, Hönig D, Möbius D. Orbit 14 (1995) 17-24.

## Anexo a la bibliografía

[www.ksvnima.com](http://www.ksvnima.com)

[http://www.accurion.com/imaging-ellipsometry\\_products](http://www.accurion.com/imaging-ellipsometry_products)

VB Fainerman, D Vollhardt, Cap 3 y cap 4 en Organized monolayers and assemblies, Ed D Mobius, R Miller, Elsevier 2002.

J Torrent-Burgués, G Oncins, F Sanz, Contributions to Science 4 (2008) 177.

J Torrent-Burgués, Colloids Surf A 396 (2012) 137.

J Torrent-Burgués, F Vocanson, JJ Pérez-González, A Errachid, Colloids Surf A 401 (2012) 137.

J Hoyo, J Torrent-Burgués, E. Gaus, J Colloid Interf Sci 384 (2012) 189.

S Leporatti, PhD Thesis

S Yu Zaitzev, AA Turshatov, D Mobius, SP Gromov, MV Alifimov, Colloid Surf A 354 (2010) 51.

D Vollhardt, Adv Colloid Interf Sci 123-126 (2006) 173.

Md Mufazzal hossain, K-I Iimura, T Kato, J Colloid Interf Sci 306 (2007) 391.

D Vollhardt, VB Fainermann, Adv Colloid Interf Sci 127 (2006) 83.

D Vollhardt, VB Fainermann, Adv Colloid Interf Sci 86 (2000) 103.

F Peñacorada, J Souto, JA de Saja, L Brehmer, Appl Surf Sci 246 (2005) 425.

C Japo, E Dupart, P-A Albouy, C Mingotaud, Thin Solid Films 327-329 (1998) 1.

G de Miguel et al, J Colloid Interf sci 356 (2011) 775.

JM Pedrosa et al, Phys Chem Chem Phys 4 (2002) 2329.

JM Pedrosa et al, J Phys Chem B 106 (2002) 2583.

X Li et al, J Colloid Interf sci 284 (2005) 582.

V Pérez-Gregorio et al, J Colloid Interf Sci 375 (2012) 94.

AA Turshatov et al, Colloid Surf A 329 (2008) 18.

J Crusats et al, Langmuir 20 (2004) 8668.

P Burriel, J Ignés-Mullol, R Reigada, F Sagués, Langmuir 22 (2006) 187.

JR Baena et al, Thin Solid Films 449 (2004) 215.

A Dhathathreyan, Colloid Surf A 318 (2008) 307.

I Giner et al, J Colloid Interf Sci 359 (2011) 389.

Y Hu et al, Langmuir 19 (2003) 100.

MC FriedenberG et al, Langmuir 10 (1994) 1251.

MNG de Mul, JA Mann Jr, Langmuir 10 (1994) 2311.

JA Schroter et al, Langmuir 13 (1997) 796.

Y Ikeda et al, Colloid Surf B 72 (2009) 272.

H Nakahara et al, Colloid Surf B 41 (2005) 285.

R Kumar Gupta, KA Suresh, Colloid Surf A 320 (2008) 233.

A Aroti et al, Colloid Surf A 303 (2007) 144.

DR Talham et al, Langmuir 22 (2006) 2450.

R Schmidt, CE deWolf, Langmuir 20 (2004) 3284.

A Gopal, KYC Lee, J Phys Chem B 105 (2001) 10348.

S Leporatti, G Brezesinski, H Mohwald, Colloid Surf A 161 (2000) 159.

C DeWolf et al, Chem Phys Lipids 97 (1999) 129.

S Leporatti et al, Langmuir 14 (1998) 7503.

M Nieto-Suárez et al, Colloid Surf A 321 (2008) 189.

A Cruz et al, Biophys J 86 (2004) 308.

D Vollhardt et al, Langmuir 19 (2003) 4228.

G de Miguel et al, J Phys Chem B 109 (2005) 3998.

K Wojciechowski et al, langmuir 22 (2006) 8409.

M Broniatowski, P Dynarowicz-Latka, Langmuir 22 (2006) 2691.

C-W Chen et al, Thin Solid Films 515 (2007) 7299.

G Pera et al, Chem mater 19 (2007) 857.

M Haro et al, Langmuir 2007.

M Haro et al, Langmuir 21 (2005) 2796.

P Cea et al, Current Topics Colloid Interf Sci 6 (2003) 1.

S Martin et al, J Colloid Interf sci 308 (2007) 239.

S Martin et al, Surf Sci 563 (2004) 27.

A Villares et al, J Phys Chem B 111 (2007) 7201.

M Pérez-Morales et al, J Phys Chem B 108 (2004) 4457.

JJ Giner-Casares et al, J Colloid Interf Sci 315 (2007) 278.

G de Miguel et al, J Mater Chem 17 (2007) 2914.

SJ Mejia-Rosales et al, J Phys Condens Matter 14 (2002) 4795.

J Galvan-Miyoshi et al, J Chem Phys 115 (2001) 8178.

SJ Mejia-Rosales et al, Phys A 276 (2000) 30.

RD Cadena-Nava et al, Chem Phys Rev.

TI Sergeeva et al, Colloids Surf A 264 (2005) 207.

M Badis et al, Langmuir 20 (2004) 6259.

M Nieto-Suárez et al, Colloid Surf A 249 (2004) 11.

S Ramos, R Castillo, J Chem Phys 110 (1999) 7021.

J Ignés-Mullol, DK Schwartz, Langmuir 17 (2001) 3017.

TI Sergeeva et al, Colloids Surf A 255 (2005) 201.

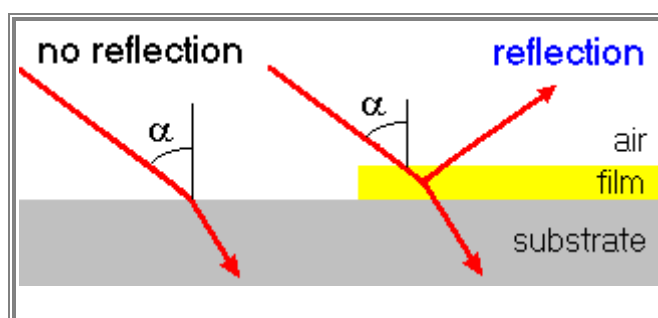
## Anexos

### Anexo 1. Fundamentos del BAM

Cuando un haz de luz polarizada-p, es decir polarizada paralelamente al plano de incidencia, incide sobre un sustrato dieléctrico, hay un ángulo de incidencia específico donde no se produce reflexión alguna. Toda la luz se refracta en el sustrato. Un detector que observe la luz reflejada producirá una señal de salida de mínima intensidad (idealmente cero) para este ángulo, encontrado por sir David Brewster en 1815. El ángulo de Brewster está relacionado con los índices de refracción de los dos medios ópticos (Figura) mediante la relación:

$$\tan \alpha = n_{\text{sustrato}} / n_{\text{aire}}$$

Si sobre el sustrato se encuentra una película delgada con un índice de refracción distinto del sustrato, entonces no se cumple la condición del ángulo de Brewster, ni en la interficie aire/película ni en la interficie película/sustrato. Sin embargo, algunas reflexiones ocurren en ambas interfaces, y también puede haber reflexiones múltiples en la película. Todas estas reflexiones se superponen coherentemente y producen una señal que puede ser detectada con un sensor (por ejemplo, con una cámara CCD).



**Figura.** Fundamentos de la microscopía de ángulo de Brewster.

La intensidad reflejada depende del espesor de la película y de sus parámetros ópticos.

En el caso de una típica monocapa orgánica (espesor 2 nm) ésta es del orden de una millonésima parte de la intensidad incidente. Esto no es mucho pero es aún suficiente para

producir, mediante un objetivo de microscopio, imágenes bien contrastadas y con una buena resolución espacial.

### **El Microscopio BAM**

El sistema BAM debe ser visto sobretodo como un microscópio, puesto que su sistema de formación de imágenes se realiza a través de un objetivo de microscópio sobre una cámara CCD. Lo diferente respecto a los microscópios convencionales es que la iluminación se realiza con un ángulo de incidencia de aproximadamente 53 grados y la observación y la captura de imágenes con una inclinación también de aproximadamente 53 grados para captar la luz reflejada especularmente en la muestra.

El BAM utiliza el principio del ángulo de Brewster aire/agua como sistema de mejora del contraste en las imágenes, lo que da lugar a buenos contrastes en capas muy delgadas, incluso cuando estas capas son monomoleculares, lo que le convierte en un instrumento de muy alta sensibilidad para obtener imágenes de películas muy delgadas y estructuras superficiales que se formen sobre materiales dieléctricos transparentes, sobre todo los que se forman sobre la superficie del agua. Ello permite además obtener información cuantitativa de las imágenes (por ejemplo, la distribución del tamaño de los dominios) con una resolución lateral de hasta una micra, dependiendo del objetivo de microscopio utilizado.

El BAM consiste en una unidad optomecánica formada por dos bancos ópticos formando el ángulo de Brewster, con la normal a la superficie del agua. En el banco óptico de iluminación se encuentra el láser de Helio-Neón y el polarizador. El banco óptico de detección incluye un objetivo de microscopio de larga distancia de trabajo, un analizador y la cámara CCD. Completa el equipo una fuente de alimentación para el láser de He-Ne y un ordenador al cual se conecta la cámara CCD en la que se captan las imágenes que se producen de la superficie del agua, en la situación de ángulo de reflexión de Brewster.

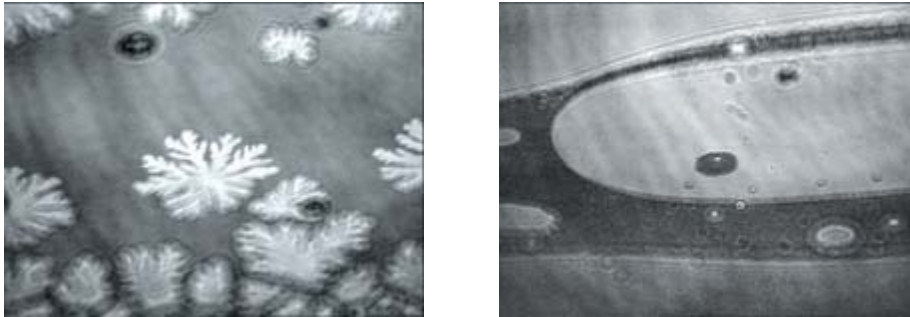
El polarizador se utiliza para polarizar la luz láser en el plano p. El analizador para optimizar el contraste de las imágenes que se forman en el CCD y en el caso de capas anisotrópicas, el analizador cambia la relación entre la luz reflejada p y la luz reflejada s, cambiando con ello los contrastes, e incluso invirtiéndolos girando simplemente el analizador. Este efecto puede ser usado para distinguir el contraste debido a anisotropías causadas por la densidad y/o el espesor en películas isotrópicas. Éstas preservan el estado de polarización p de la luz incidente.

La estructura o base es la que le da firmeza al equipo y es donde se colocan las componentes del equipo (láser, polarizadores, objetivos, cámara CCD, analizadores). Ésta debe permitir dar la



estabilidad y movilidad adecuada a las piezas antes mencionadas. Gracias al objetivo de microscopio podemos proyectar la imagen de la superficie del agua en el CCD de la cámara, el objetivo puede ser desde 4 hasta 10 aumentos, a menos que se consigan objetivos de aumentos mayores y siempre y cuando la distancia de trabajo de estos sea grande, lo suficiente para que no toquen el agua. Un inconveniente corregible es que debido a la inclinación del objetivo respecto a la superficie y a la poca profundidad de campo del objetivo, solamente se enfoca una franja de la imagen, tanto menor cuanto mayor es su aumento. La cámara CCD es nuestro “ojo”, es la encargada de recoger la imagen proyectada por el objetivo y a la vez enviarla a un ordenador, donde será almacenada.

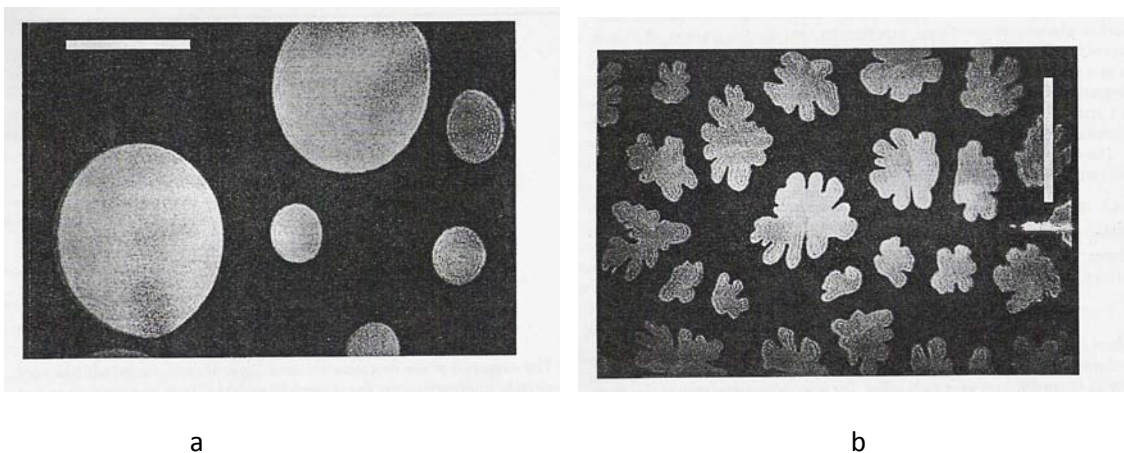
## Anexo 2. Imágenes bibliográficas de BAM



**Figura 2.1.** Imágenes obtenidas por BAM.

Las imágenes corresponden a ácidos grasos diferentes, y las estructuras que se forman dependen del tipo de sustancia que se ponga sobre la superficie del agua y de su concentración. Para la primera foto, lo que se busca es estudiar simetrías y ángulos entre estructuras.

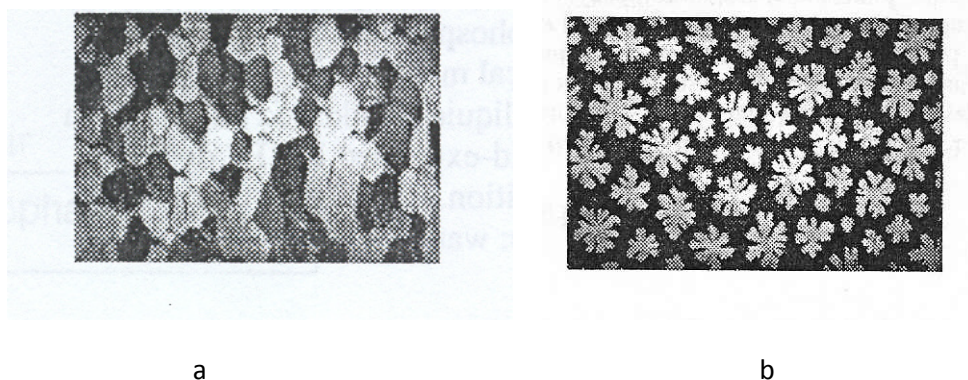
En la Figura 2.2a se muestra una imagen de un ácido graso, ácido pentadecanoico, a presión superficial de 5 mN/m y en la Figura 2.2b de un fosfolípido, dimeristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), a presión superficial de 8 mN/m. Por una parte, estas imágenes muestran la formación de dominios; dichos dominios corresponden a una fase condensada de la película y aparecen en color claro, mientras que el fondo oscuro corresponde al agua o a una fase expandida de la película. Por otra parte, estas imágenes muestran grandes diferencias en la forma de los dominios que forman estas dos sustancias; mientras que el ácido pentadecanoico muestra dominios de forma circular, el DMPE forma dominios irregulares.



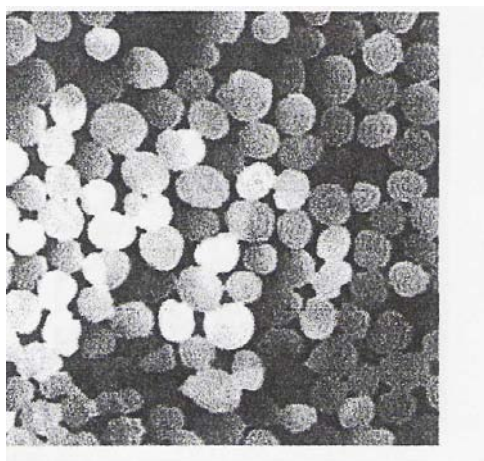
**Figura 2.2.** Imagen BAM de: a) ácido pentadecanoico, b) DMPE.

En la Figura 2.3 se muestran otras imágenes correspondientes a diferentes ácidos grasos y lípidos; en la Figura 2.3a se muestra el ácido palmítico y en la Figura 2.3b se muestra un esfingolípido como la esfingomielina. Aquí también puede observarse la diferencia entre los dominios formados por ambas sustancias, y que los dominios del ácido palmítico son circulares, mientras que los del esfingolípido son irregulares, con una marcada morfología en estrella. Sin embargo, no todos los lípidos presentan dominios irregulares, y algunos de ellos, como el DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol), también pueden presentar dominios circulares, tal como se muestra en la Figura 2.4a. Sin embargo, la forma de los dominios depende en gran medida de la presión superficial de la monocapa, y pueden observarse cambios al ir comprimiéndola. Tampoco todos los ácidos grasos presentan siempre dominios regulares o circulares, y en la Figura 2.4b se muestra el caso del ácido esteárico fluorado. En la Figura 2.4c se muestra la imagen BAM correspondiente al ácido mirístico, la cual si presenta dominios circulares.

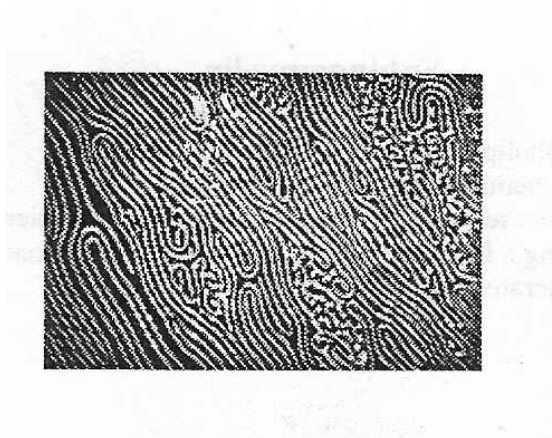
Otras imágenes de BAM pueden observarse en la literatura especializada y también en las páginas web de constructores de equipos para películas Langmuir y Langmuir-Blodgett, tales como NIMA y KSV.



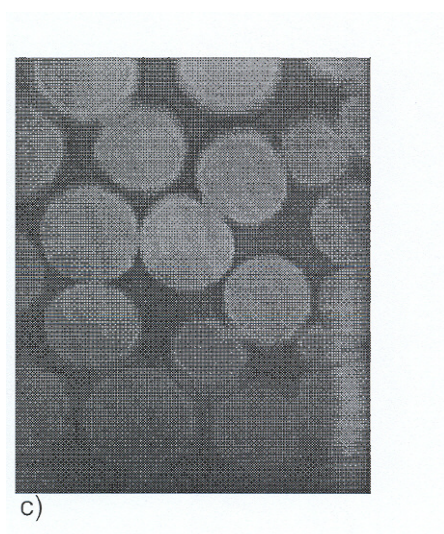
**Figura 2.3.** Imagen BAM de: a) ácido palmítico, b) esfingolípido.



a)



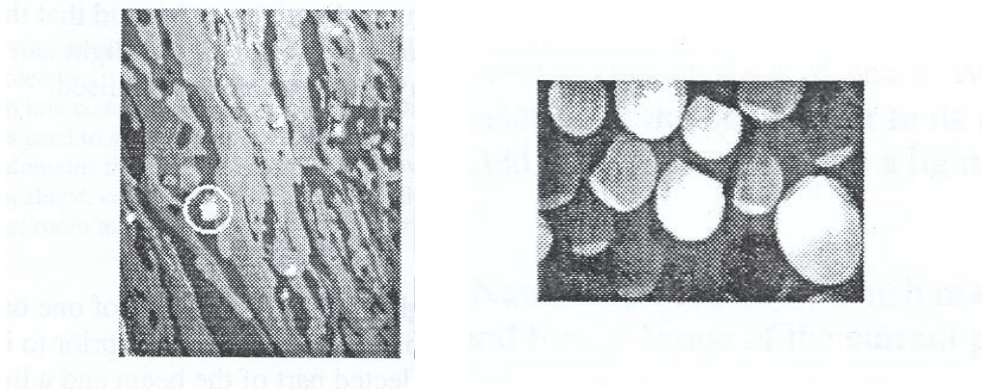
b)



c)

**Figura 2.4.** Imagen BAM: a) del fosfolípido DPPG, b) ácido esteárico fluorado, c) ácido mirístico.

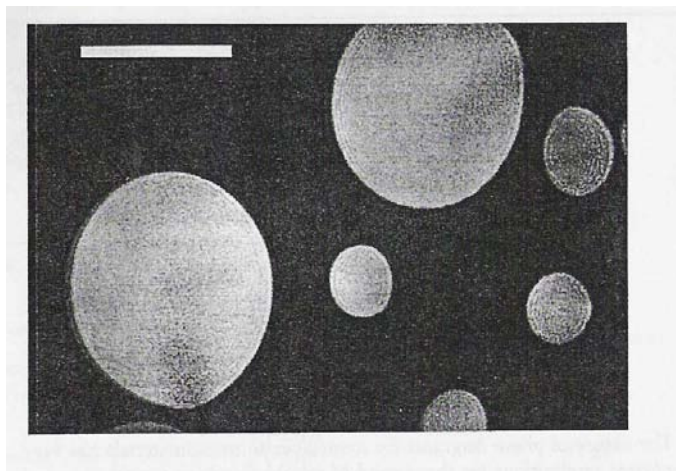
Para el ácido araquídico aún a compresiones bajas, se presenta una monocapa anisotrópica recubriendo el agua, tal como puede observarse en la imagen de BAM de la figura 2.5a. Cuando la cadena es más corta, como en los ácidos mirístico o pentadecanoico, se observan imágenes de BAM con dominios lenticulares (Figura 2.5b), que corresponden a dominios de fase LC en una fase de LE. Otro ácido que también presenta este comportamiento es el ácido palmítico. El ácido pentadecanoico presenta la fase LE solo a presiones superficiales bajas, por debajo de unos 6 mN/m a 25°C, y por encima de este valor se presenta la fase de LC y S.



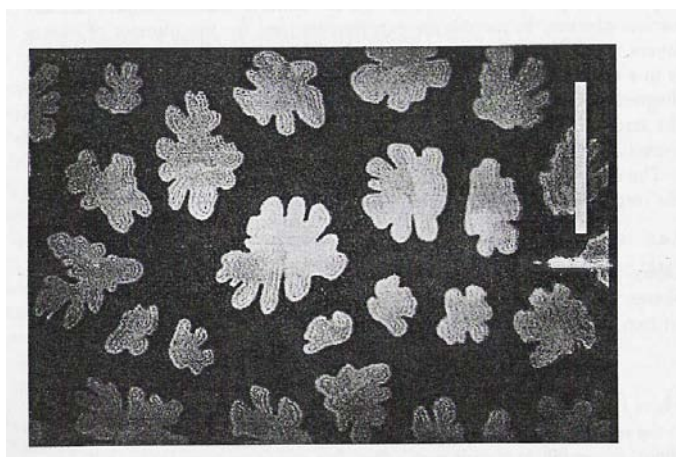
**Figura 2.5.** Imagen obtenida por BAM de una monocapa de a) ácido araquídico, b) ácido pentadecanoico .



Otras figuras de BAM de la bibliografía

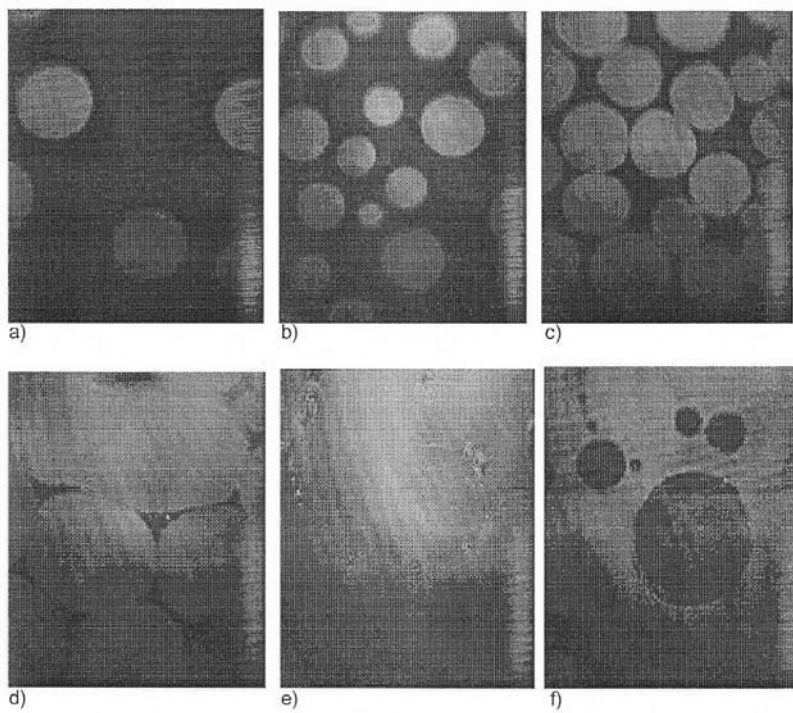


PDA-Petty



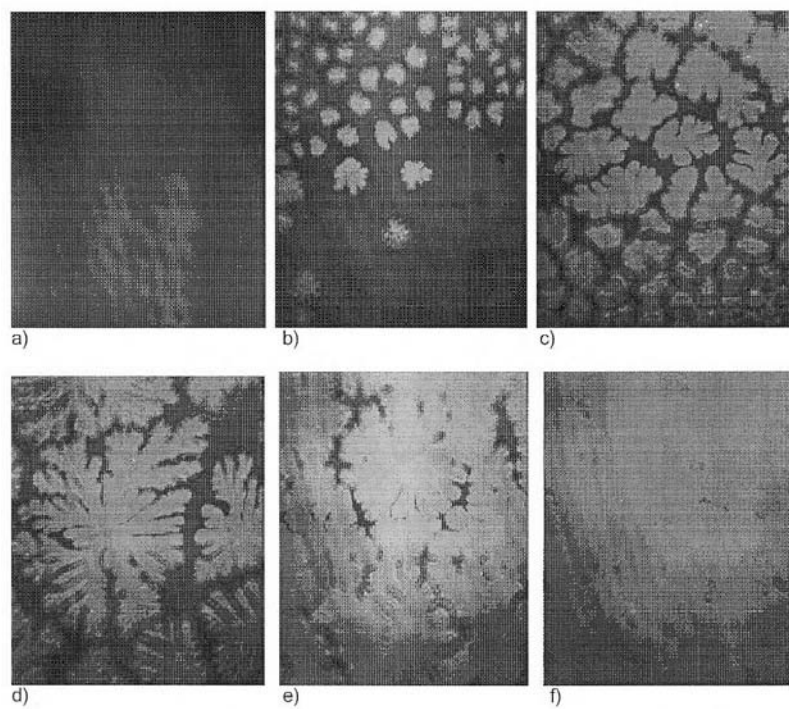
DMPE-Petty

Fig A1



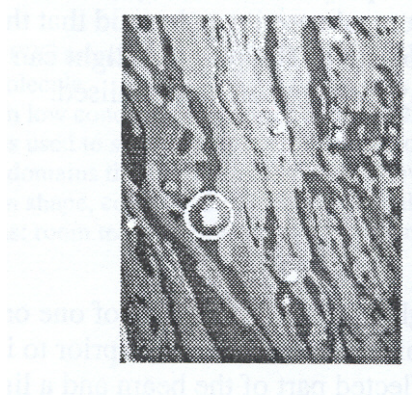
MA-ksv

Fig A2



DMPE-ksv

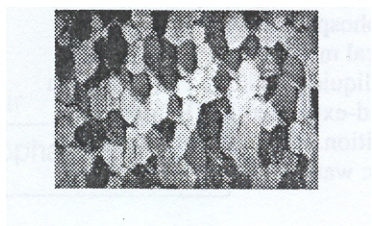
Fig A3



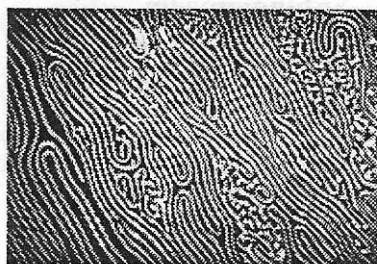
araqui

Fig A4

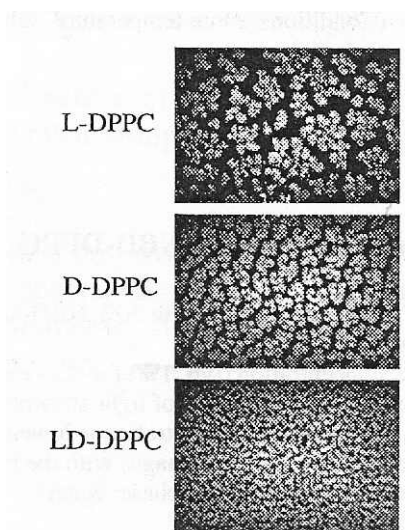




palmitic



SAfluor

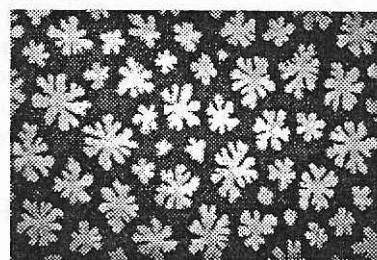


L-DPPC

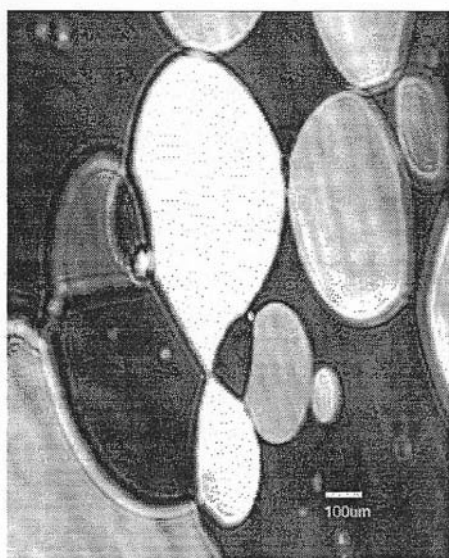
D-DPPC

LD-DPPC

DPPC

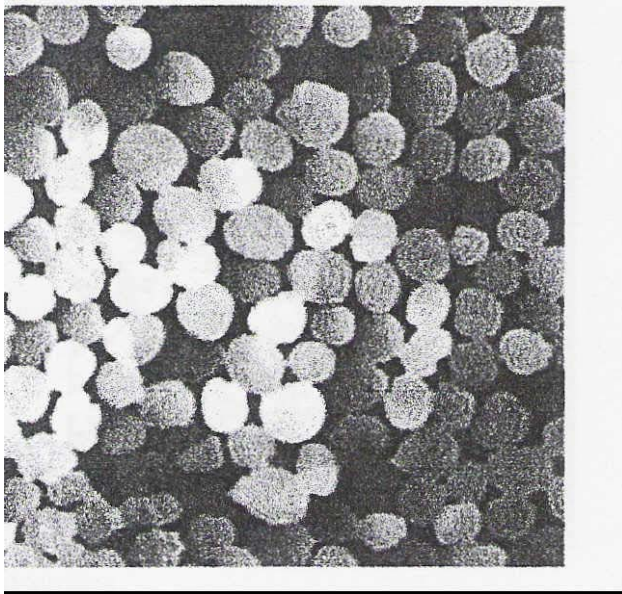


sfingo

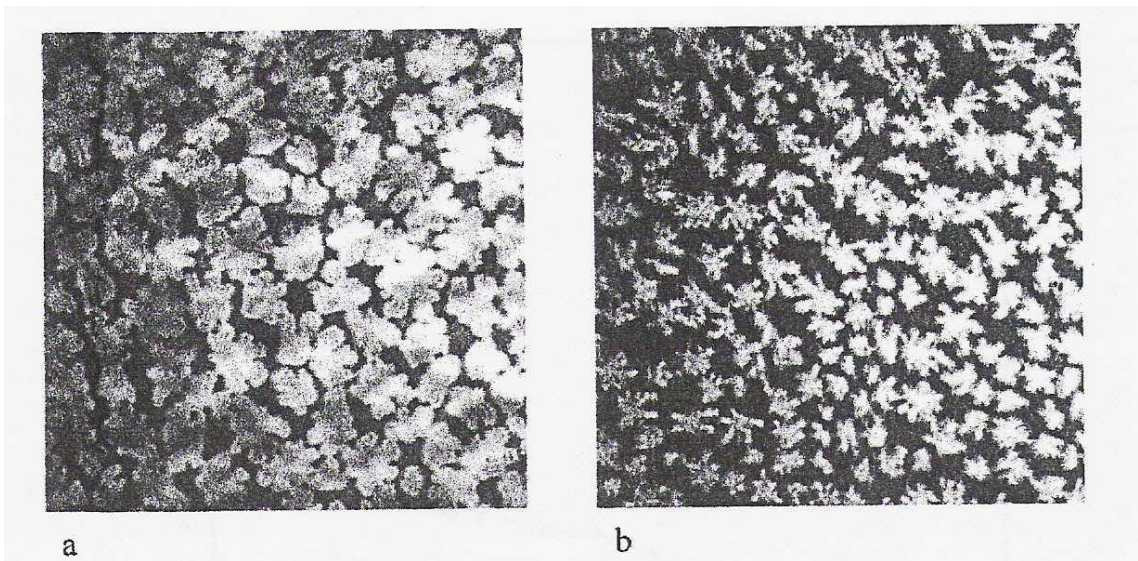


8CB

Fig A5

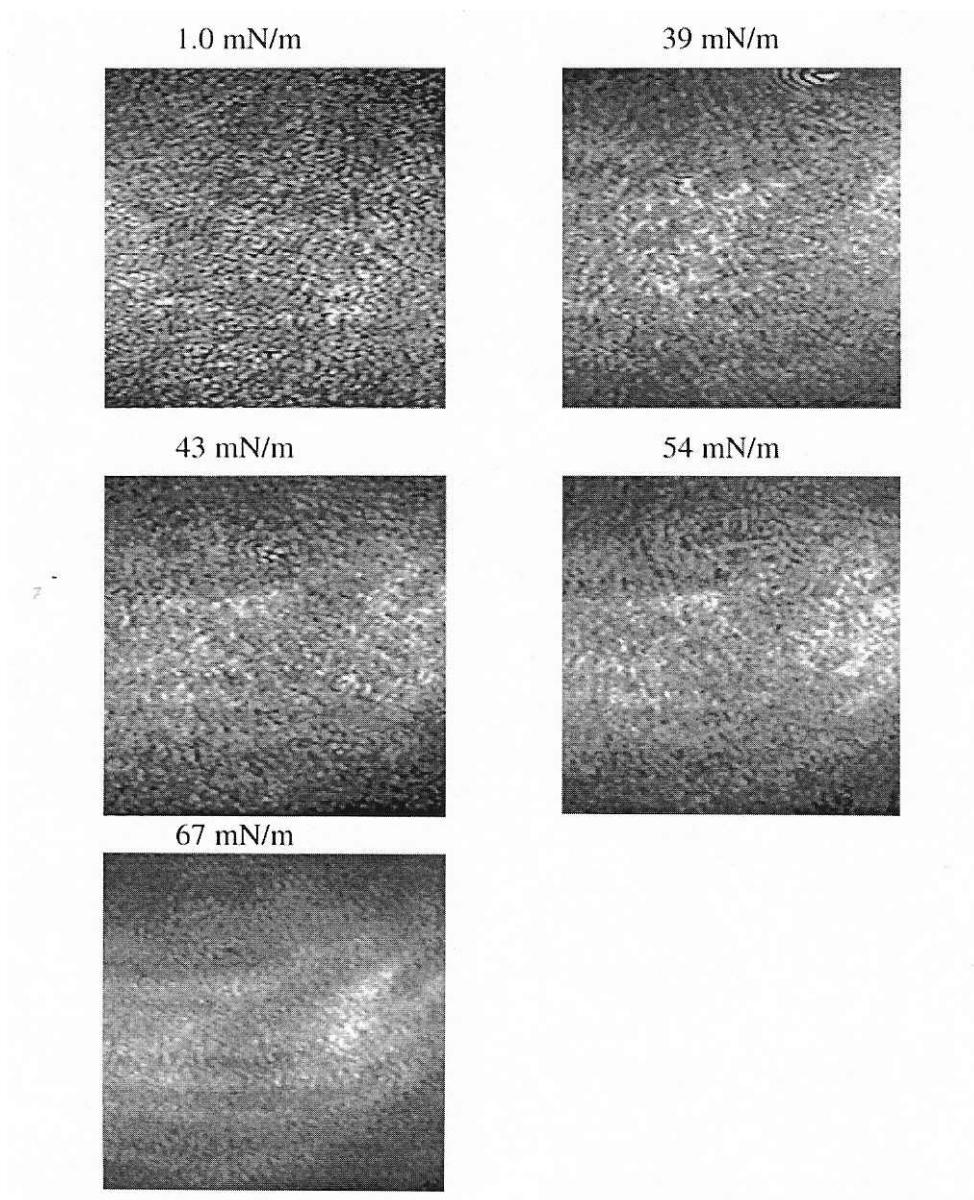


DPPG1 Vollhardt



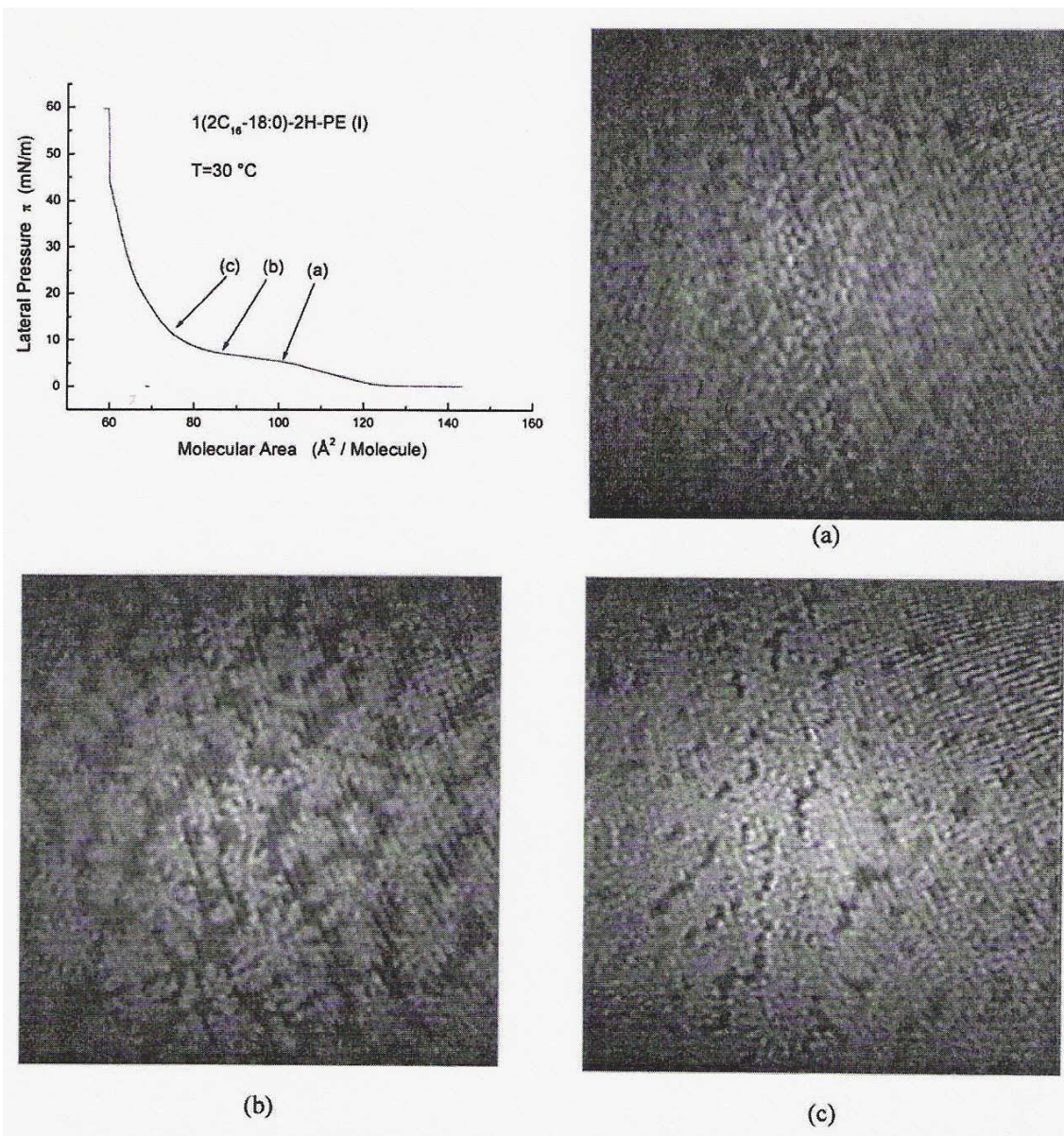
DPPG2 Vollhardt

Fig A6

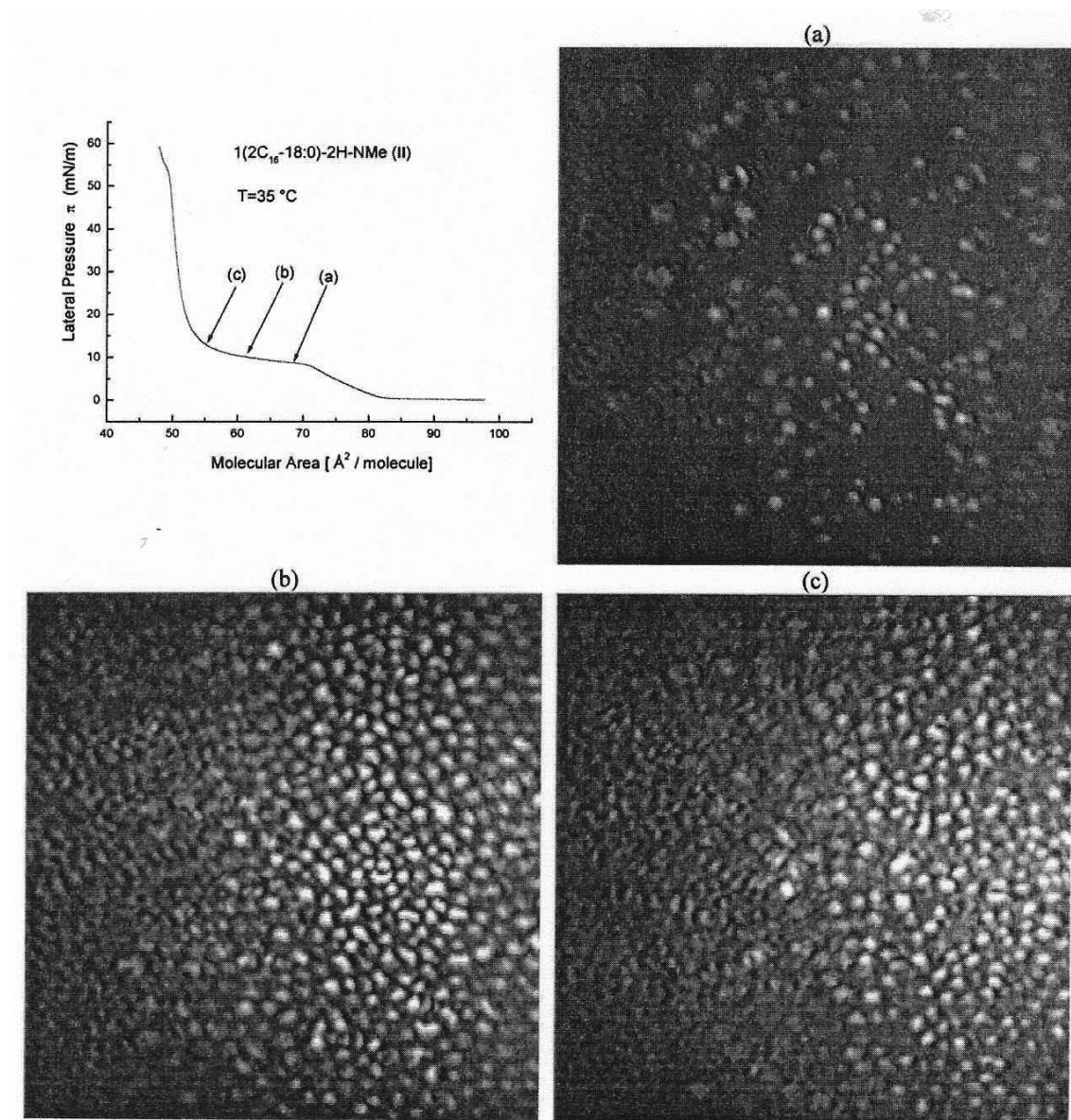


DSPC/PI Lepo





Compl Lepo



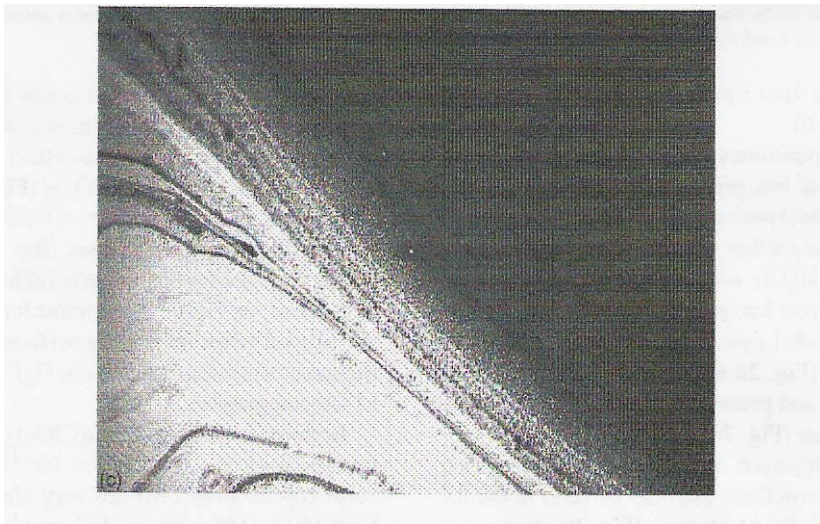
ComplI Lepo

Fig A7



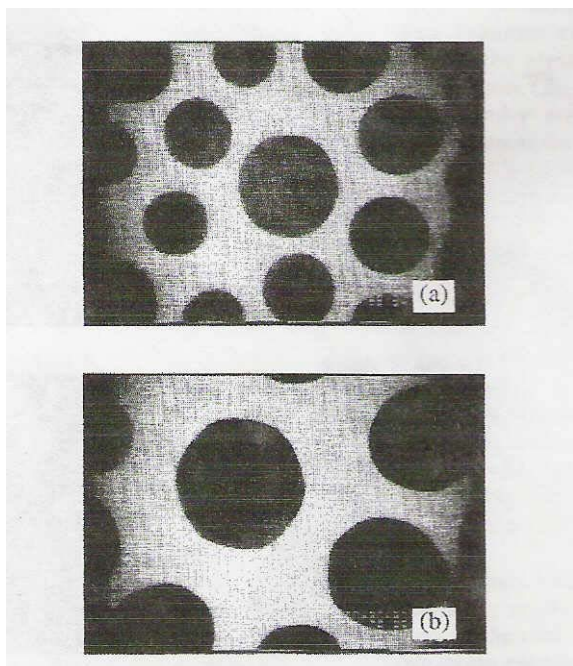


dye1 c-serge



due1 bis c-serge

Fig A8



Qiu

Fig A9

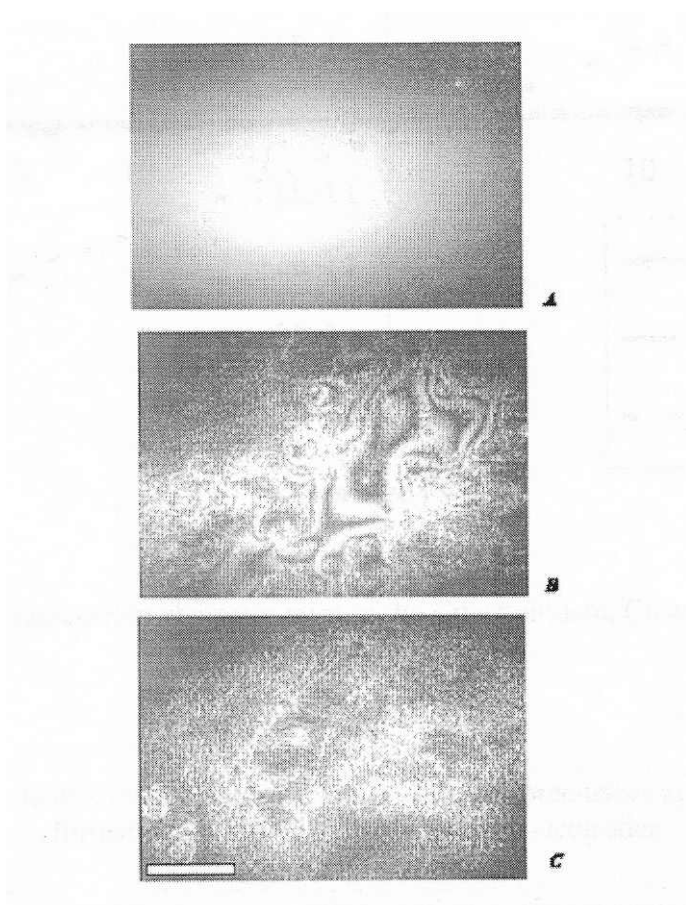


Fig A10 Cu araqi Erokin

at high surface pressures.

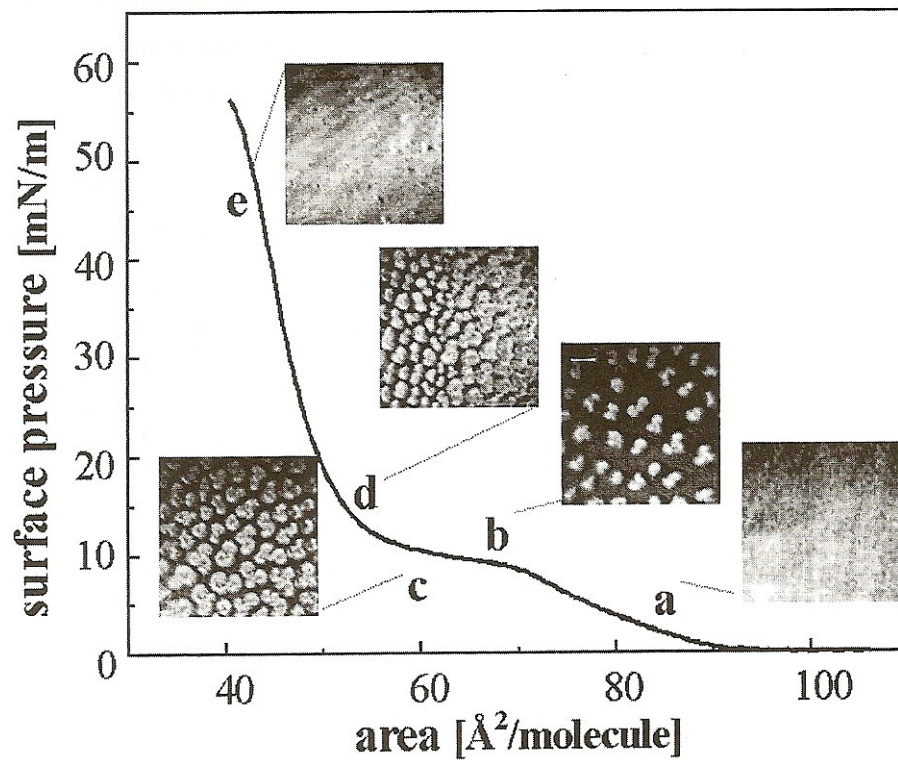


Fig. 15. Formation and growth of condensed phase domains in pure DPPC monolayers corresponding with the designated points (a) – (e) of the  $\Pi$ -A isotherm at  $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (a) At  $A > A_c$  no condensed phase domains are not formed. (b)–(c) Formation and growth of condensed phase domains in the two-phase coexistence (plateau) region. (d) Deformation and first coalescence with increasing surface pressure. (e) Continuous condensed phase at high surface pressures [19].



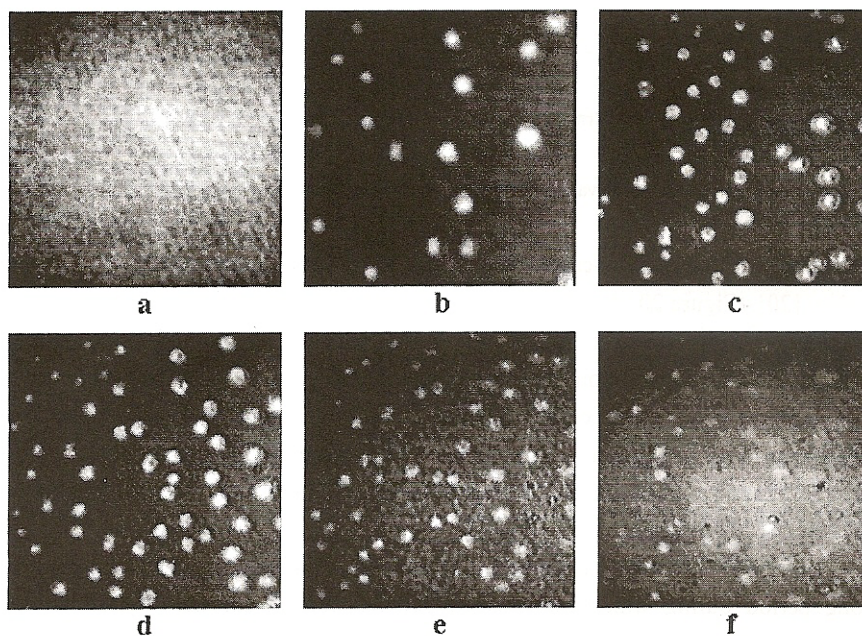
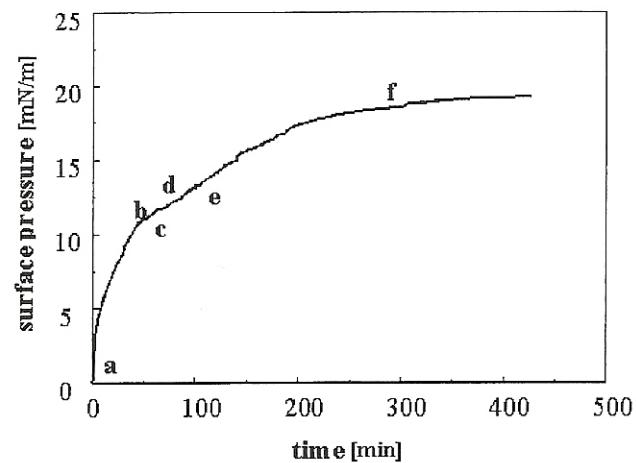


Fig. 16. Penetration dynamics for  $\beta$ -lactoglobulin penetration at  $A = 1.20 \text{ nm}^2$  per one DPPC molecule. The  $\Pi(t)$  penetration kinetics curve indicates the first order phase transition point after 29 min. A sequence of BAM images (a) – (f) is shown according to the letters of the  $\Pi(t)$  transients [19].

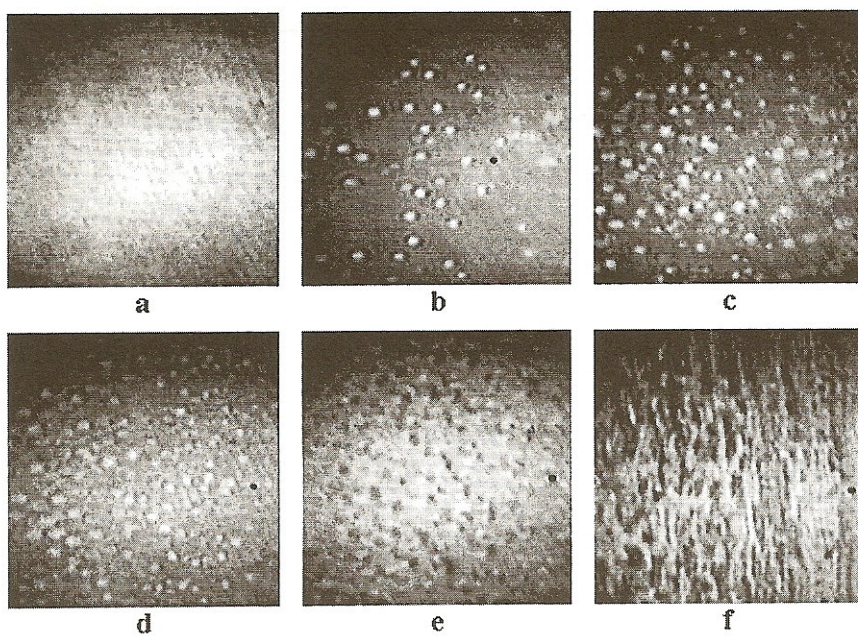
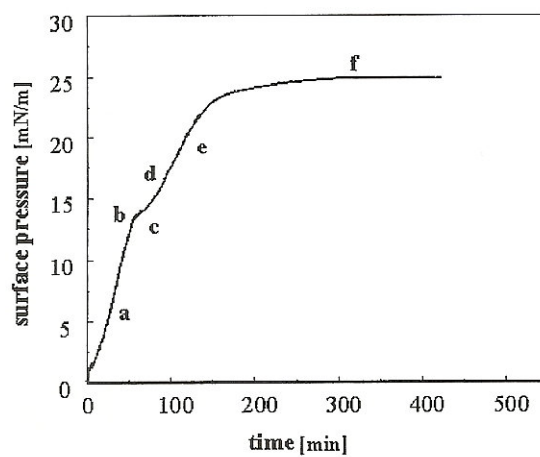


Fig. 20. Penetration dynamics for  $\beta$ -casein penetration at solution concentration  $10^{-7}$  mol/l at  $A = 0.92 \text{ nm}^2$  per one DPPC molecule. The  $\Pi(t)$  penetration kinetics curve indicates the first order phase transition point after 3100 s. A sequence of BAM images (a) – (f) is shown according to the letters of the  $\Pi(t)$  transients [20].

Imágenes de BAM de coadsorción de mezclas.

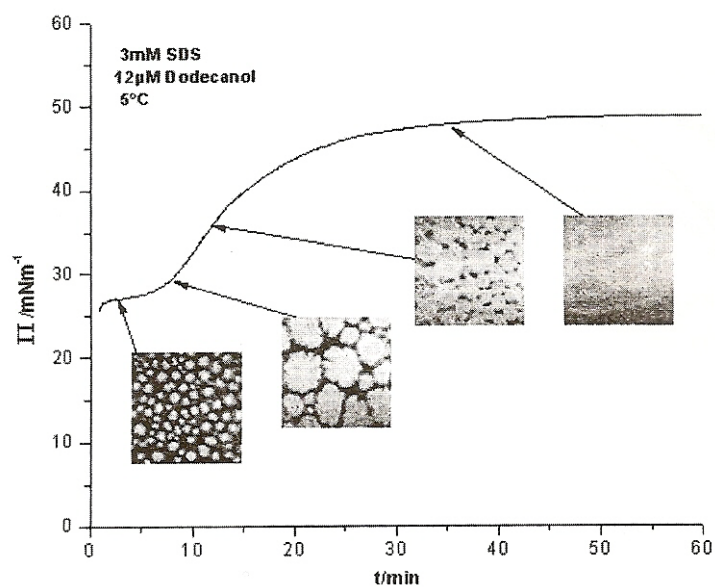


Fig. 22. BAM images obtained after the break point in the  $\Pi(t)$  curve of a aqueous 3mM SDS/12μM dodecanol solution at different times and at 5 °C.

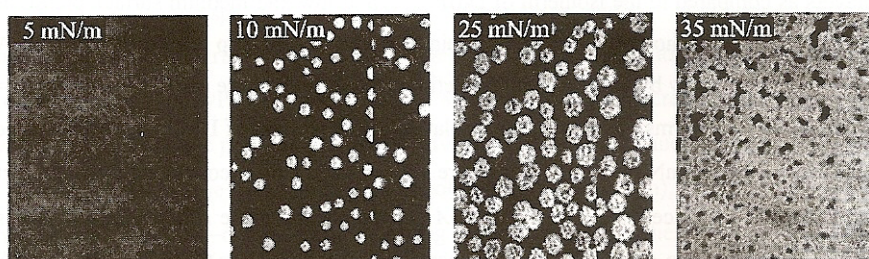
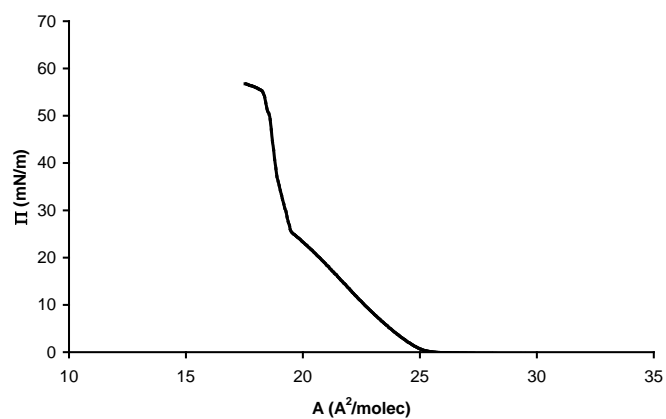


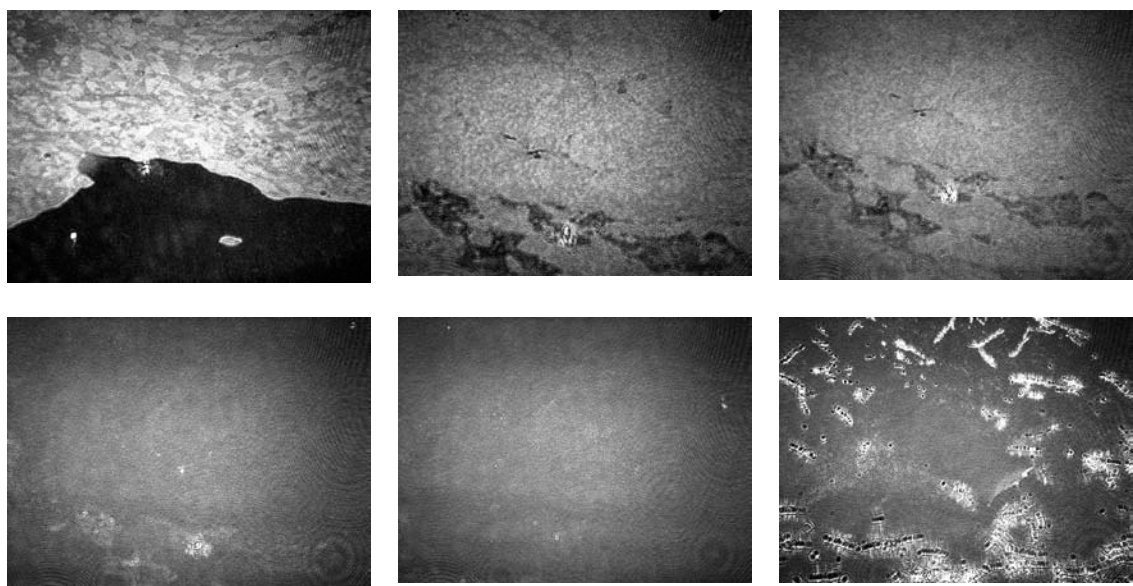
Fig. 11 Brewster angle microscope images of a monolayer of PO3:DMPA = 1:4 at the air-water interface at different surface pressures  $\pi$  (mN/m) as indicated.



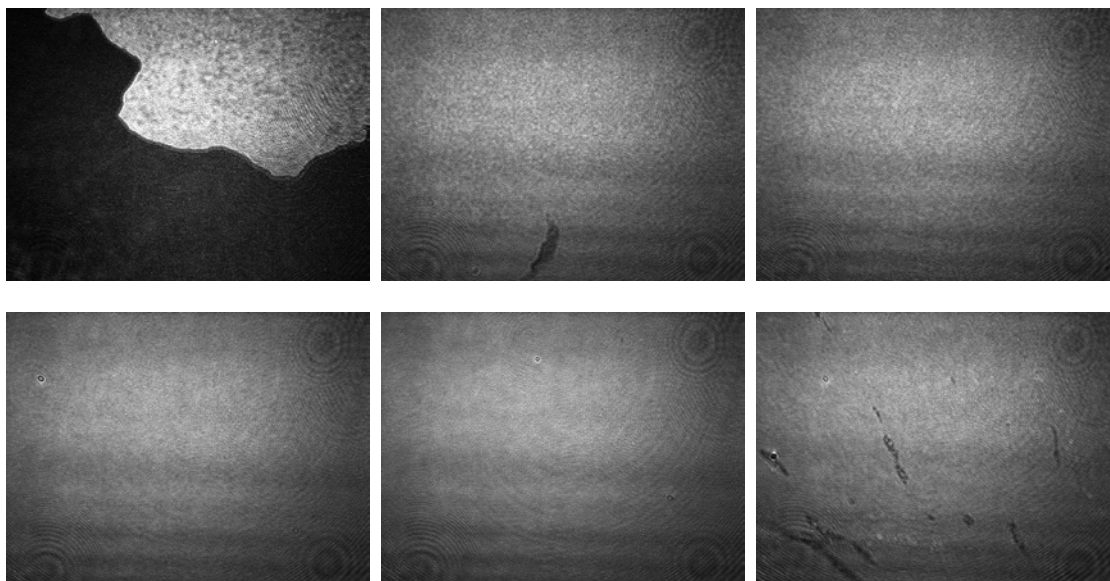
### Anexo 3. Imágenes de AA.



**Figura 3a.** Isoterma para el ácido araquídico, a 21°C

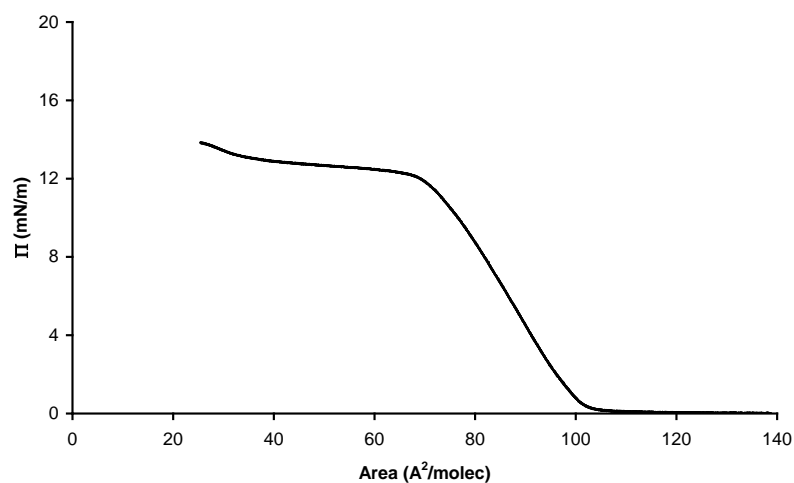


**Figura 3b.** Imágenes de BAM ( $3,6 \times 4,1 \text{ mm}^2$ ) de una monocapa de ácido araquídico a las presiones superficiales (en mN/m) de: arriba) 0,2, 2, 10, abajo) 30, 45, colapso.

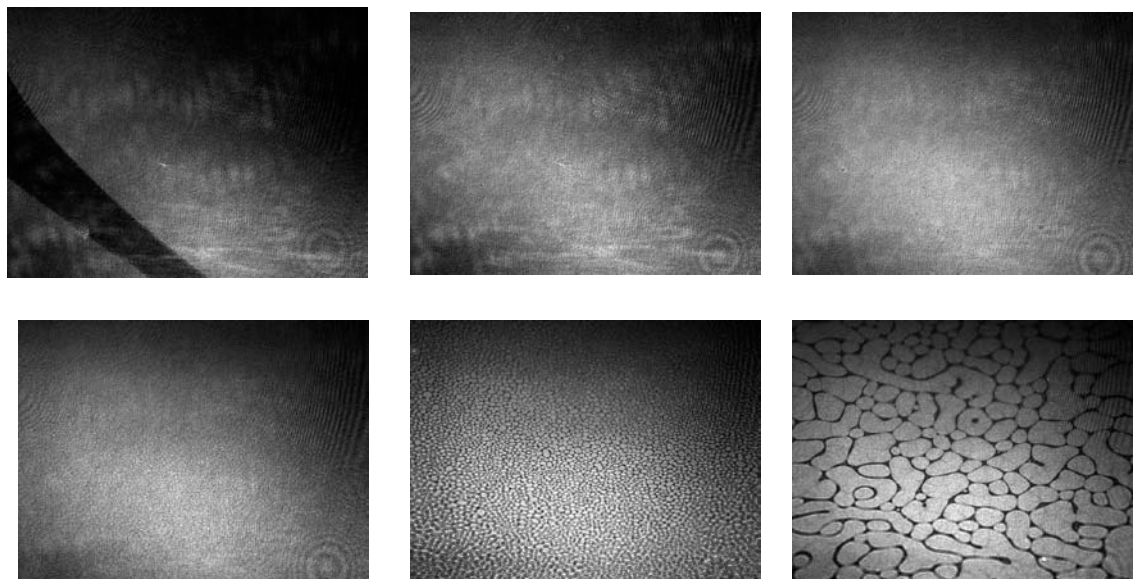


**Figura 3c.** Imágenes de BAM de una monocapa de AA a las presiones de: A) 0 mN/m, B) 0.5 mN/m, C) 4 mN/m (arriba), D) 17 mN/m, E) 40.5 mN/m, F) colapso (abajo).

#### Anexo 4. Imágenes de un tiomacrocíclo.

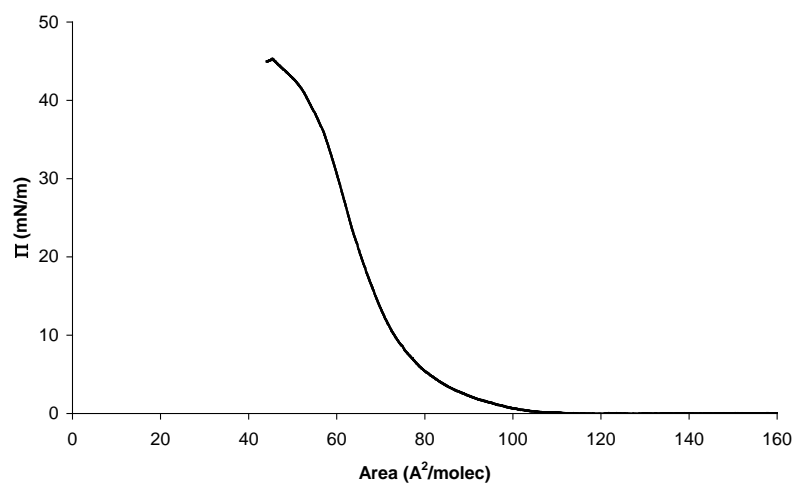


**Figura 4a.** Isoterma para el macrociclo de la Figura 9, a 21°C

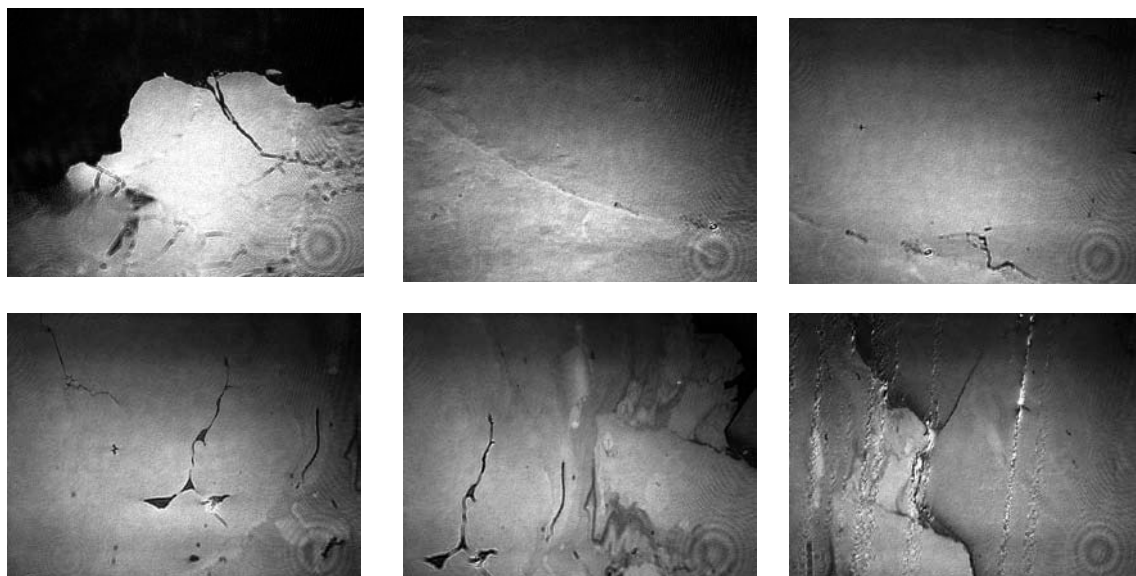


**Figura 4b.** Imágenes de BAM ( $3,6 \times 4,1 \text{ mm}^2$ ) de una película del compuesto macrocíclico de la figura 9, a las presiones superficiales (en mN/m) de: arriba) 0,3, 2, 10, abajo) 12,4, 13,4, 13,8.

## Anexo 5. Imágenes de una ftalocianina de zinc.



**Figura 5a.** Isoterma para tetra-tert-butilftalocianina de zinc (t-BuPcZn), a 21°C.



**Figura 5b.** Imágenes de BAM ( $3,6 \times 4,1 \text{ mm}^2$ ) de una película de ftalocianina, t-BuPcZn, a las presiones superficiales (en mN/m) de: arriba) 0, 0,3, 1,5, abajo) 5,5, 21, colapso.



**Anexo 6. BAM imágenes de oleamida, AO.**

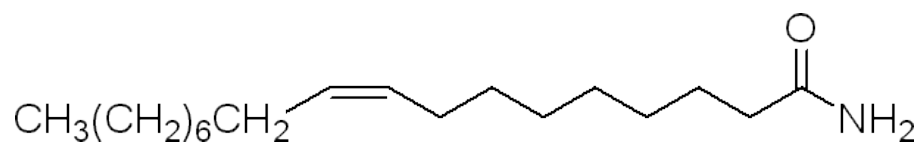


Figura 6.1. Estructura Molecular de la oleamida (OA), cis-9-octadecenamida.

**Isoterma OA**

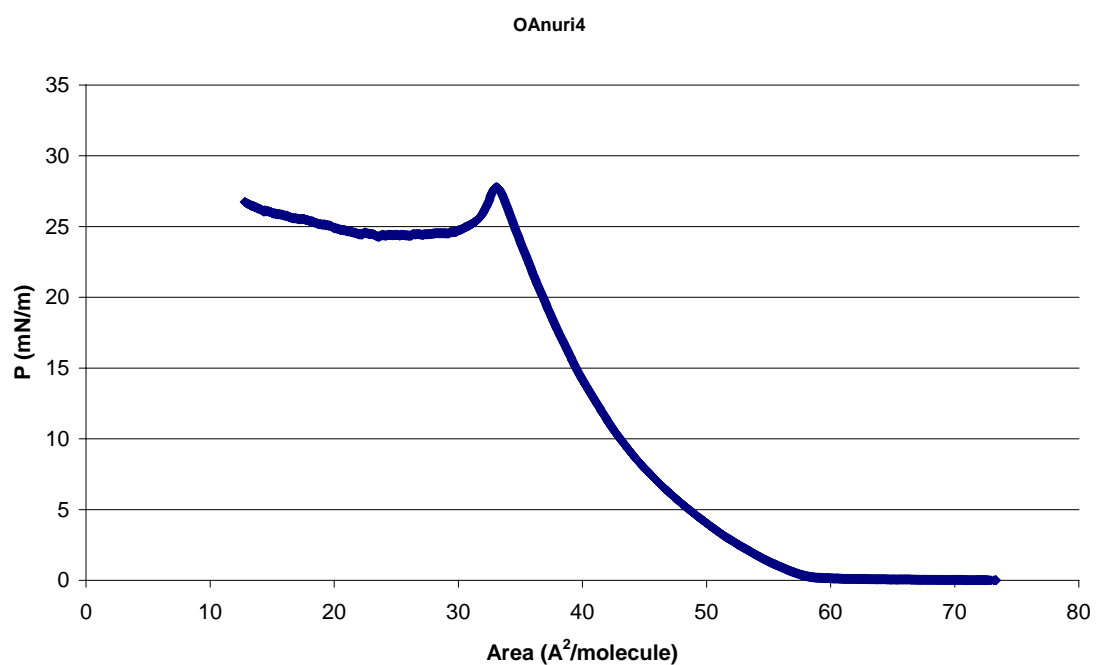
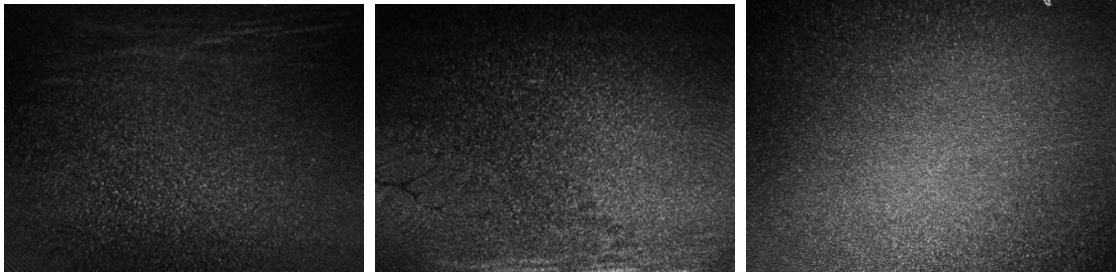


Figura 6.2. Isoterma de la oleamida.

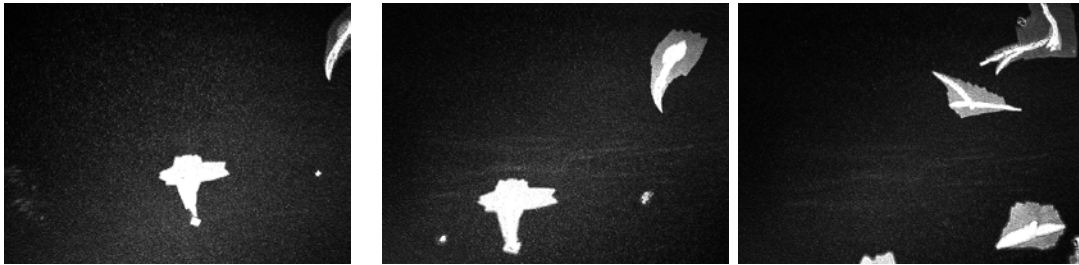
BAM OA



agua

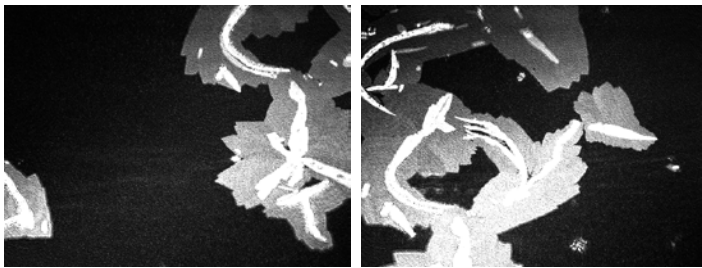
P=0.2 A=58.5

P=20.2 A=36.7



Colapso P=24.4 A=23.8 P=24.5 A=21.9

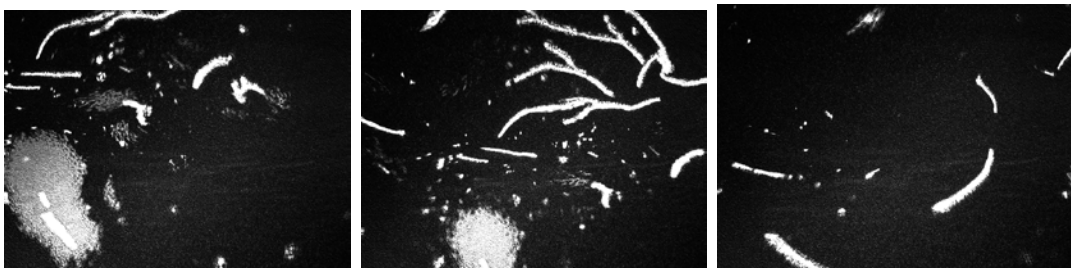
P=25.8 A=15.9



P=26.1 A=14.3

P=26.6 A=13.2

Descompresión



P=21.9 A=16.7

P=21.6 A=18.2

P=21 A=23.3

Figura 6.3. BAM imágenes de AO durante la compresión y descompresión.

Anexo 7. Imágenes de BAM de calixarenos.

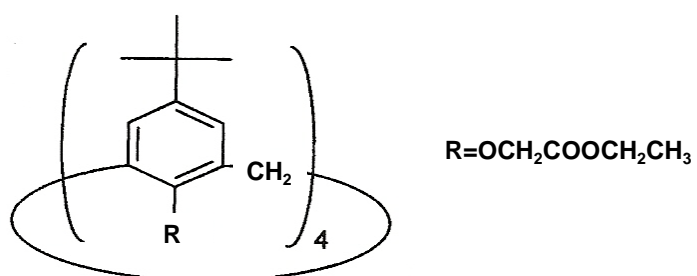


Figura 7.1a. Structure of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene ethyl ester

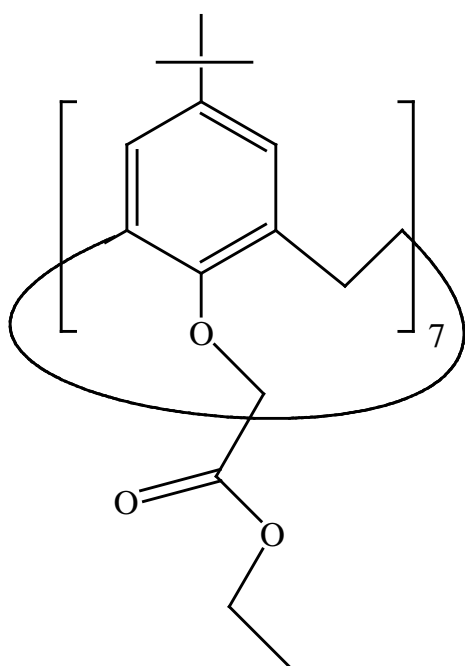
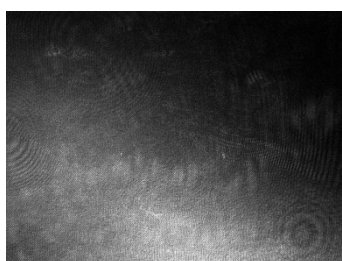
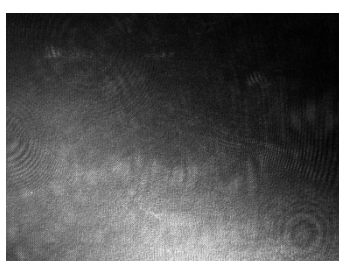


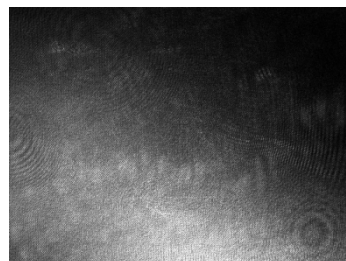
Figura 7.1b. Structure of *p*-*tert*-butylcalix[7]arene ethyl ester



$p=7.5$   $A=125$



$p=18$   $A=121$



$p=23.1$   $A=117$



$p=27.7$   $A=92$



$p=28.6$   $A=80$



$p=31.6$   $A=62$

Figura 7.2. Imágenes de BAM del calix[4]arene, a diferentes presiones y áreas de compresión (área imagen  $3.6 \times 4.1 \text{ mm}^2$ )

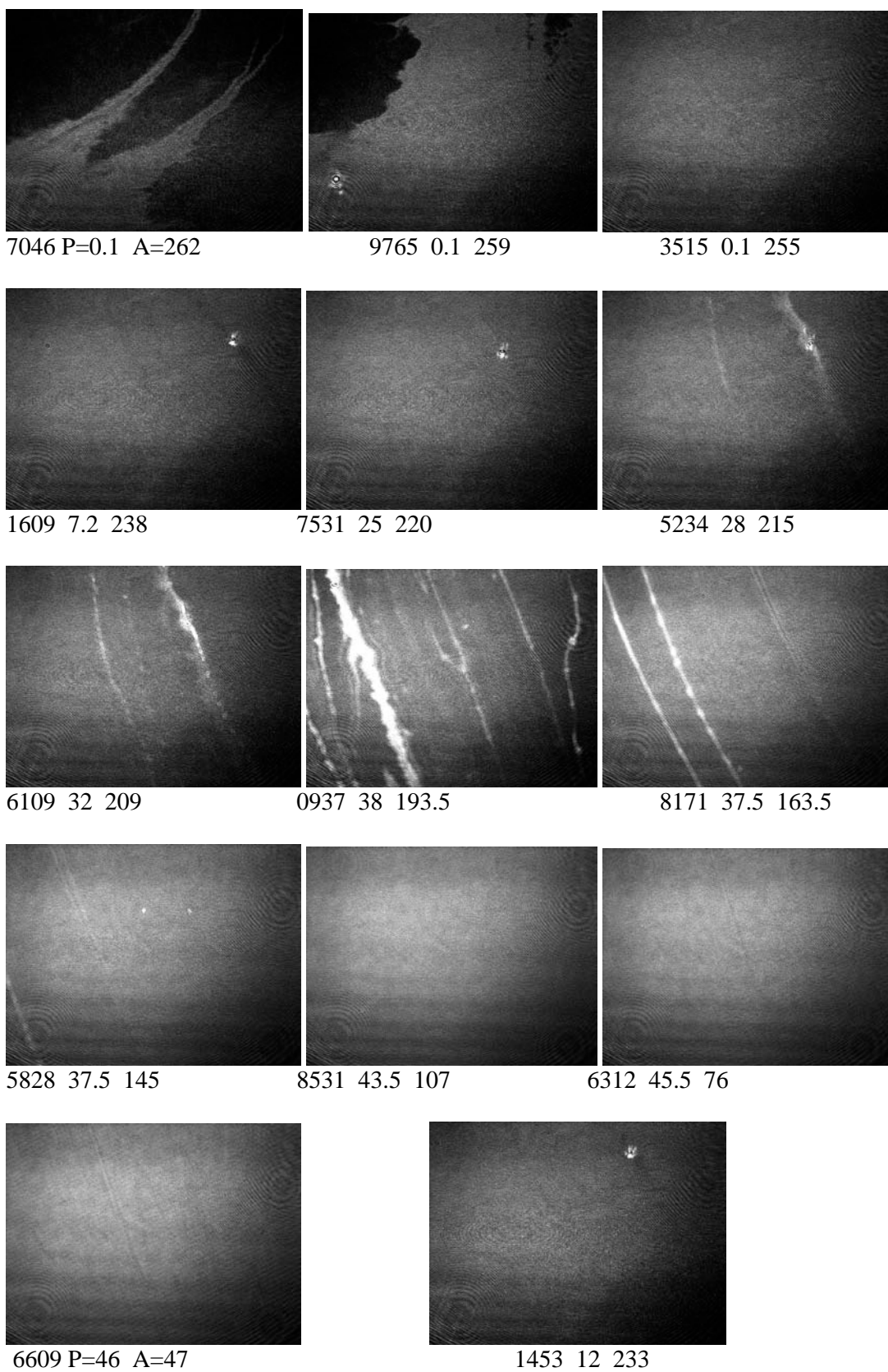


Figura 7.3. BAM imágenes del calix[7]arene a diferentes presiones y áreas de compresión.

**Anexo 8. Imágenes de BAM de adsorción y penetración de proteínas en películas de fosfolípidos y en películas de lípidos Meibomianos.**

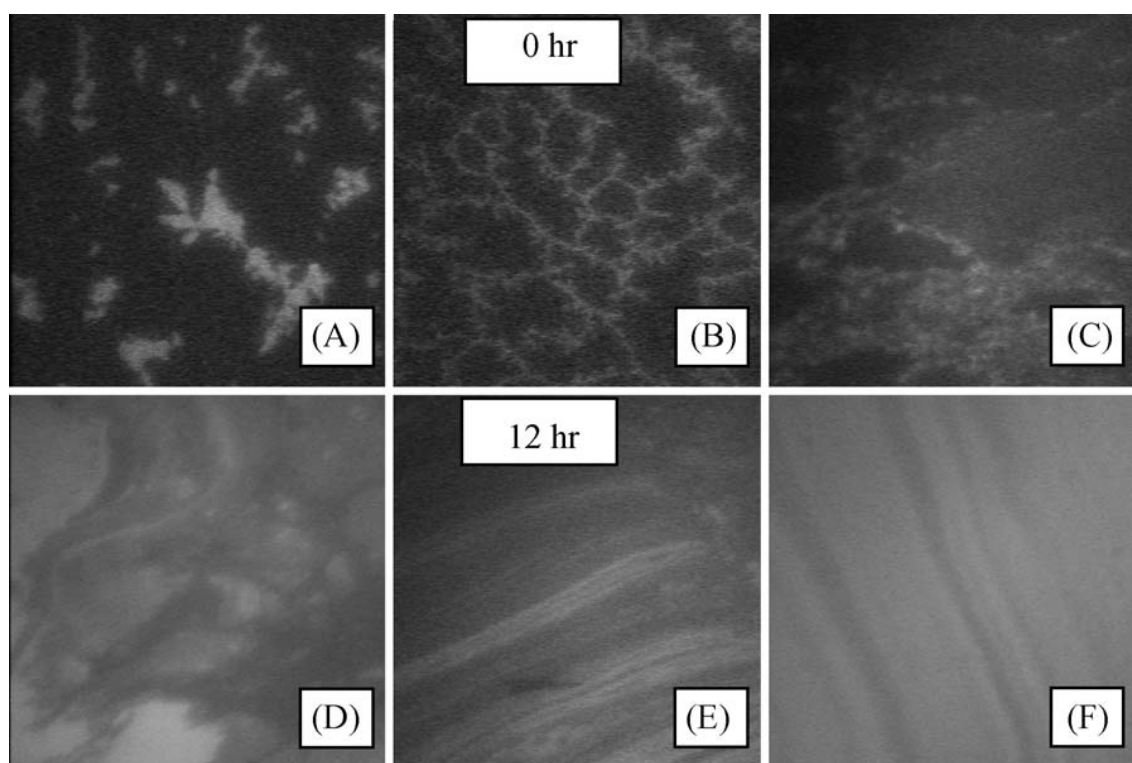


Figura 8.1. Micrographs showing the appearance of Texas red labelled lysozyme:lysozyme (5%:95%) applied to the air–buffer interface just after application (A–C), 12 h later (D and E) and 12 h after applying it into the subphase (F). A and B were both when  $\Pi = 0$ : A was when the surface area was 80 cm<sup>2</sup> and B when the surface area was 40 cm<sup>2</sup>. C was at  $\Pi = 24$  mN/m (maximum compression), D was at  $\Pi = 10$  mN/m, E was at  $\Pi = 24$  mN/m and F at  $\Pi = 16$  mN/m.

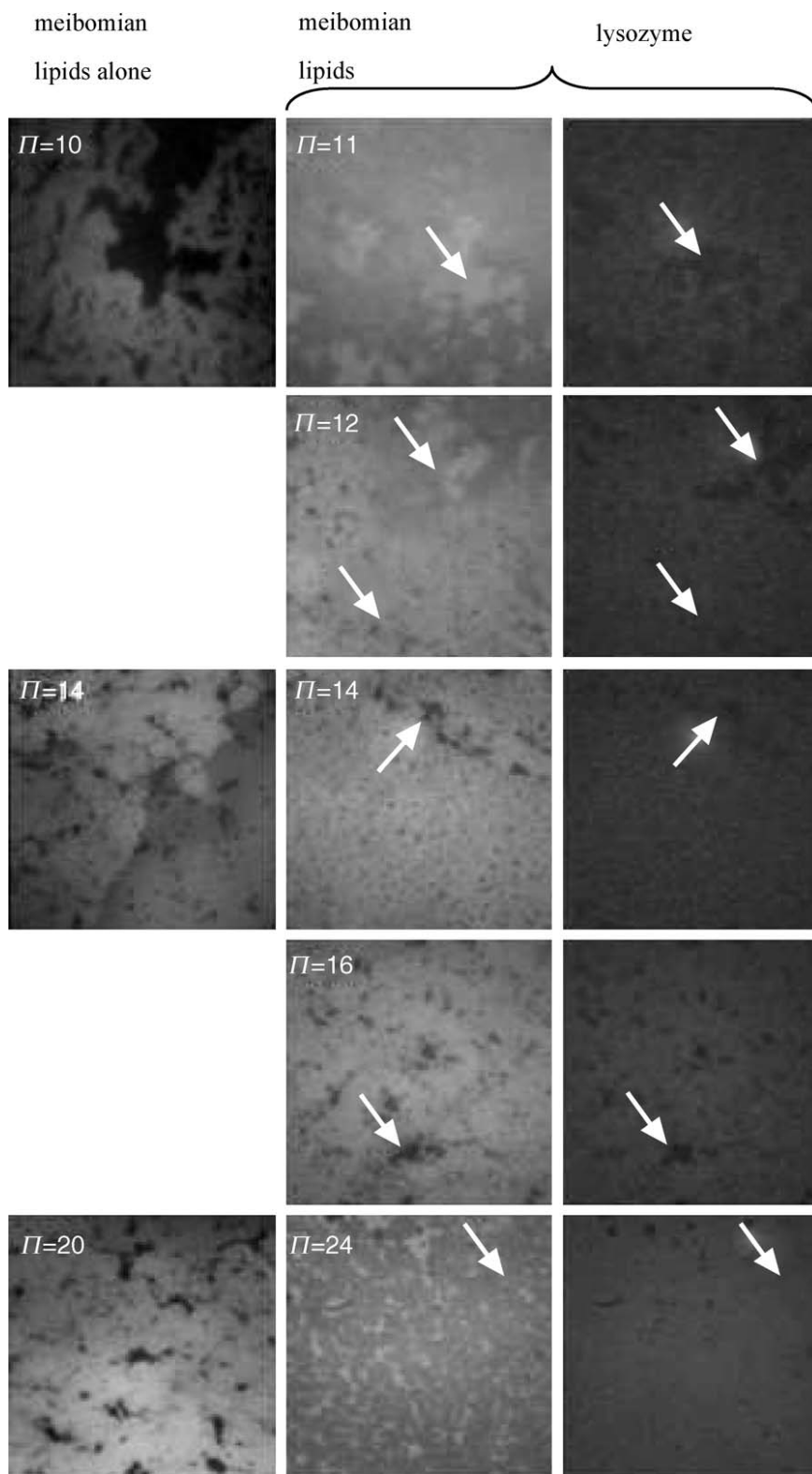


Figura 8.2. Micrographs showing a pure meibomian lipid film (left column) at different pressures, and the effects of lysozyme penetration on a meibomian lipid film set at  $\Pi_{init} = 10$  mN/m (middle and right column). Middle and right columns are matched fields showing the lipids fluorescence (middle column) and lysozyme fluorescence (right column) at different pressures as penetration progressed. Penetration caused dispersion of lipids at all pressures and initially there were lipid rich zones that excluded lysozyme (arrows). These then disappeared as the pressure increased and corresponding dark zones appeared in both films, e.g. both zone types can be seen at  $\Pi = 12$  mN/m (arrows). At the highest pressure there were bright lipid zones distributed throughout the film which had no corresponding regions in the lysozyme film.



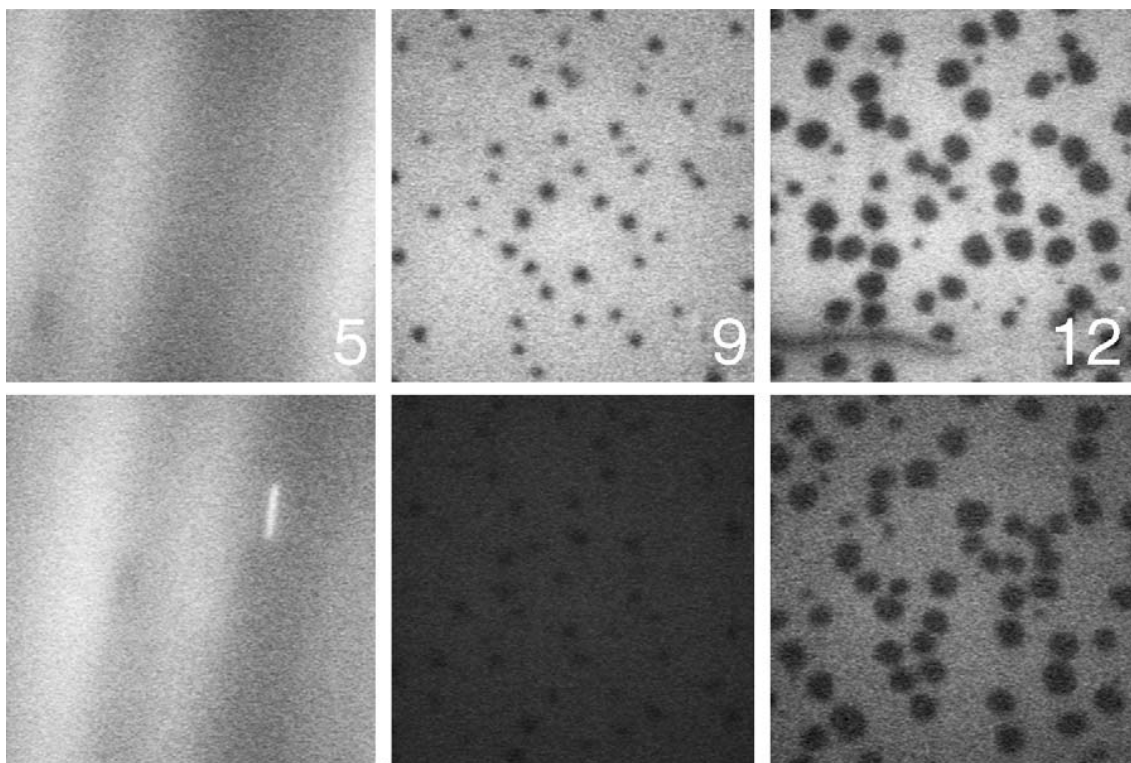


Figura 8.3. Micrograph showing penetration of lysozyme into a DPPC film originally set with  $\Pi_{\text{init}} = 0$  mN/m. The top row shows DPPC fluorescence and the bottom row lysozyme fluorescence. The numbers represent the pressure of the film at the time of the micrograph. Initially there was a striped pattern which gradually gave way to small liquid condensed (dark) regions that gradually increased in size.

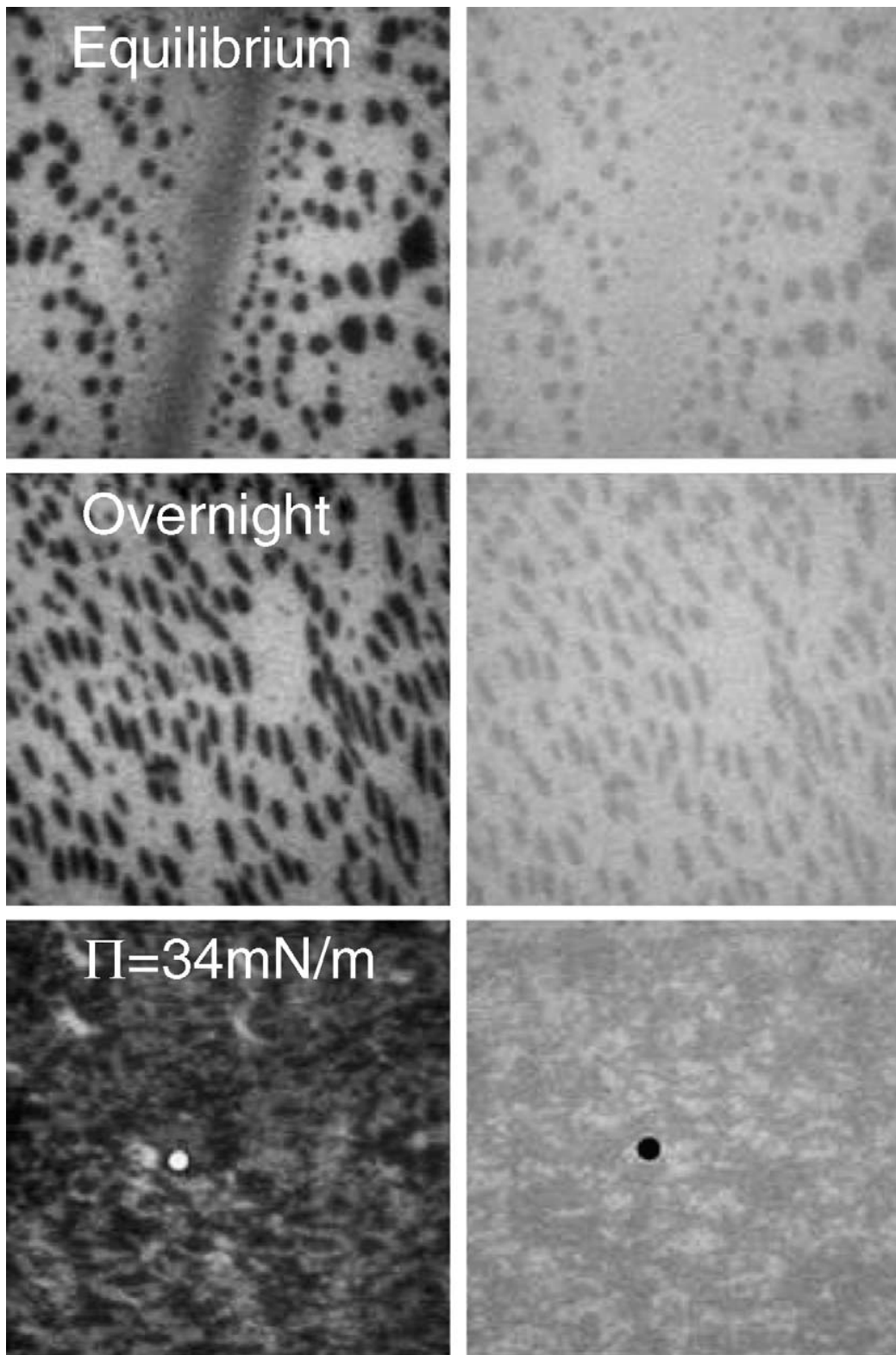


Figura 8.4. Micrographs showing a DPPC film after penetration with 10 $\times$ lysozyme which was originally set with  $\Gamma_{init} = 0$  mN/m. Left column shows DPPC fluorescence and the right column lysozyme fluorescence. The first row shows the appearance of the film once it had reached equilibrium (15 mN/m), the middle row after a further 12 h and the bottom row the same film which had been further compressed to 34 mN/m. The film is very stable in all cases (dots in bottom row show the same location), and liquid condensed areas are generally devoid of protein. However, the dark striped region in the first row has protein, and in the bottom row at high pressure, the overall organization of liquid condensed and liquid expanded regions is much disrupted.

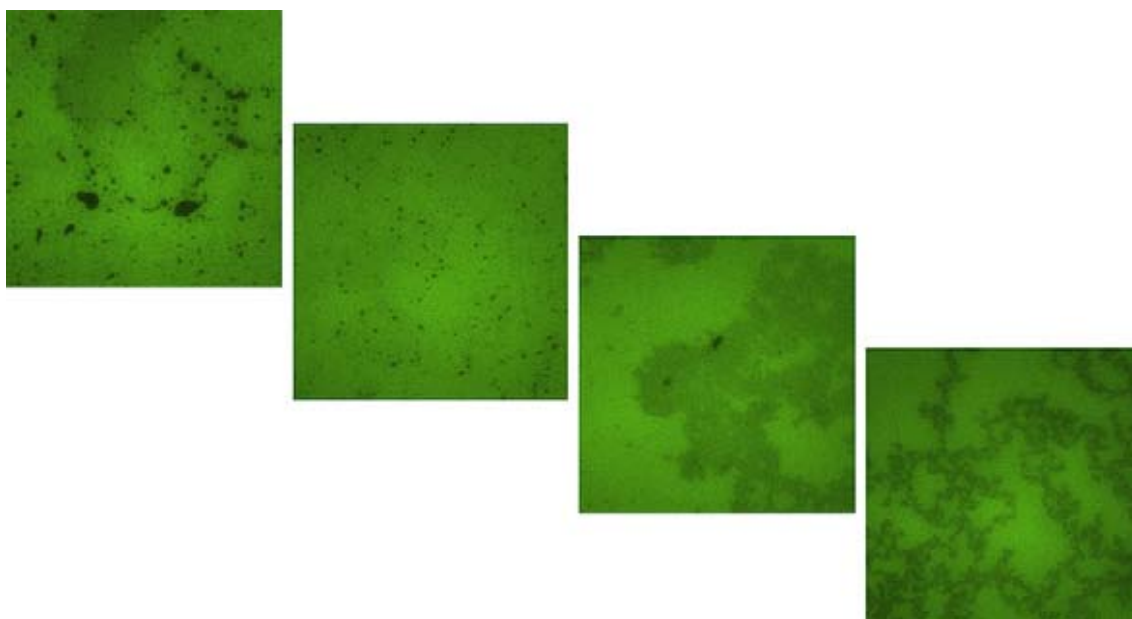


Figure 8.5. A compression and expansion isocycle of a bovine Meibomian lipid film at an air-buffer interface at 20°C. Photos depict the appearance of the film at different surface pressures.

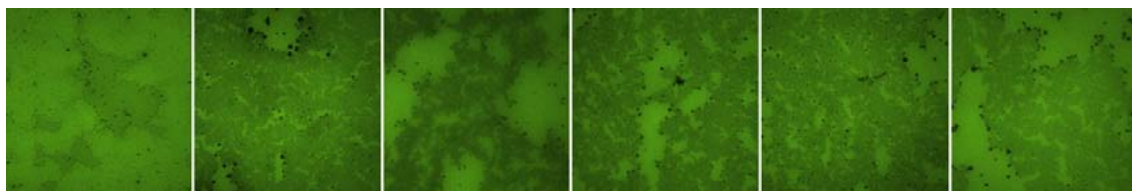


Figure 8.6. Surface pressure-time curve for the adsorption of apo-Tlc to a bovine Meibomian lipid film ( $\pi_{\text{init}} = 10 \text{ mN/m}$ ) at an air-buffer interface. Photographs show the appearance of the film at different times. (Tlc= tear lipocalin)

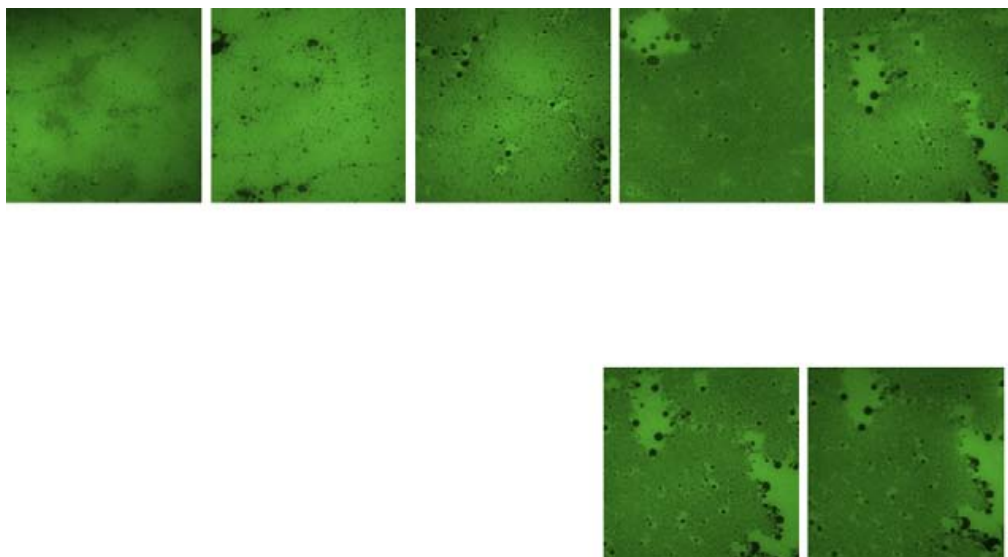


Figure 8.7.  $\pi$ -time curve for the adsorption of holo-Tlc to a bovine Meibomian lipid film ( $\pi_{\text{init}} = 10 \text{ mN/m}$ ) at an air-buffer interface. Photos show the appearance of the film at different times.

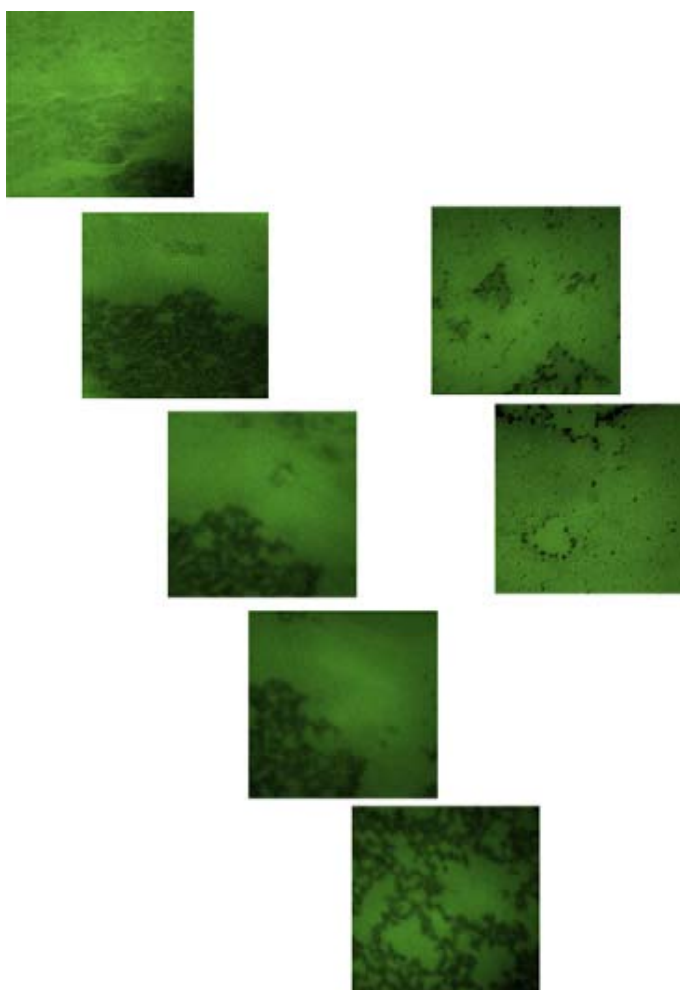


Figure 8.8. Compression and expansion isocycle after adsorption of apo-Tlc to a bovine Meibomian lipid film ( $\pi_{\text{init}} = 10 \text{ mN/m}$ ) at an air-buffer interface. Photos show difference in the appearance of the film in first (right) and subsequent (left) compressions at different surface pressures.

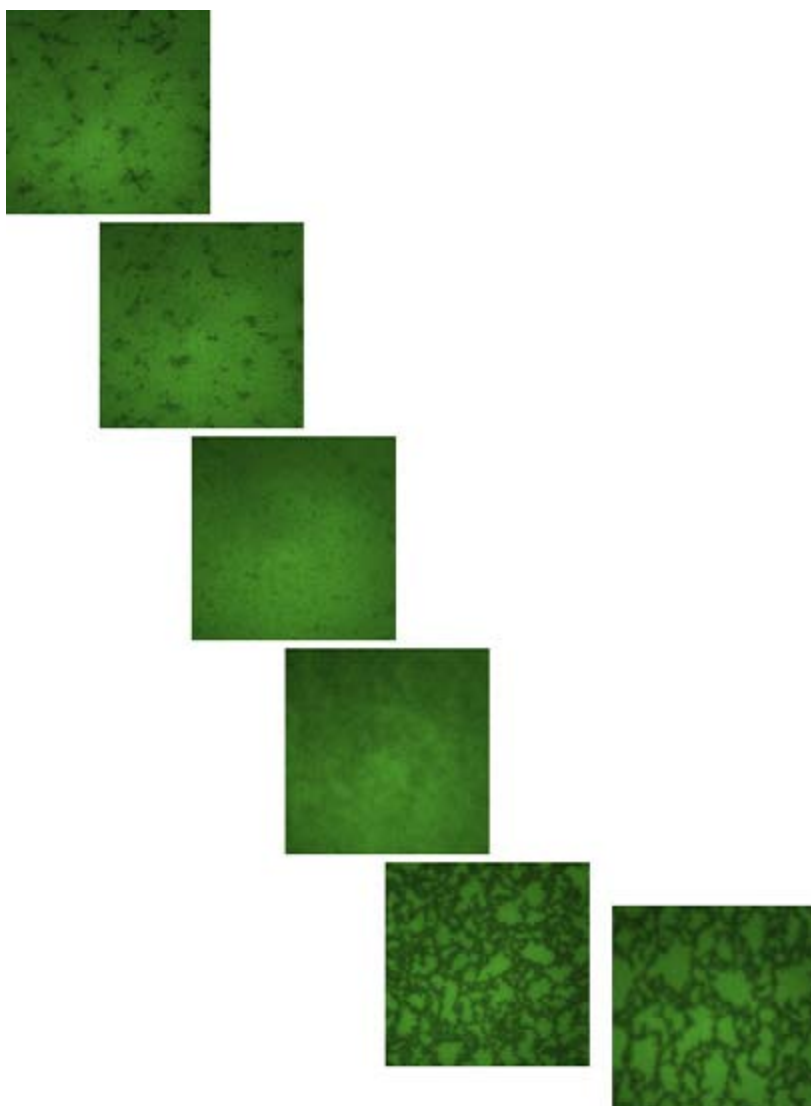


Figure 8.9. Compression and expansion isocycle after adsorption of holo-Tlc to a bovine Meibomian lipid film ( $\pi_{\text{init}} = 10 \text{ mN/m}$ ) at an air-buffer interface. Photos show appearance of the film at different surface pressures during the second isocycle.

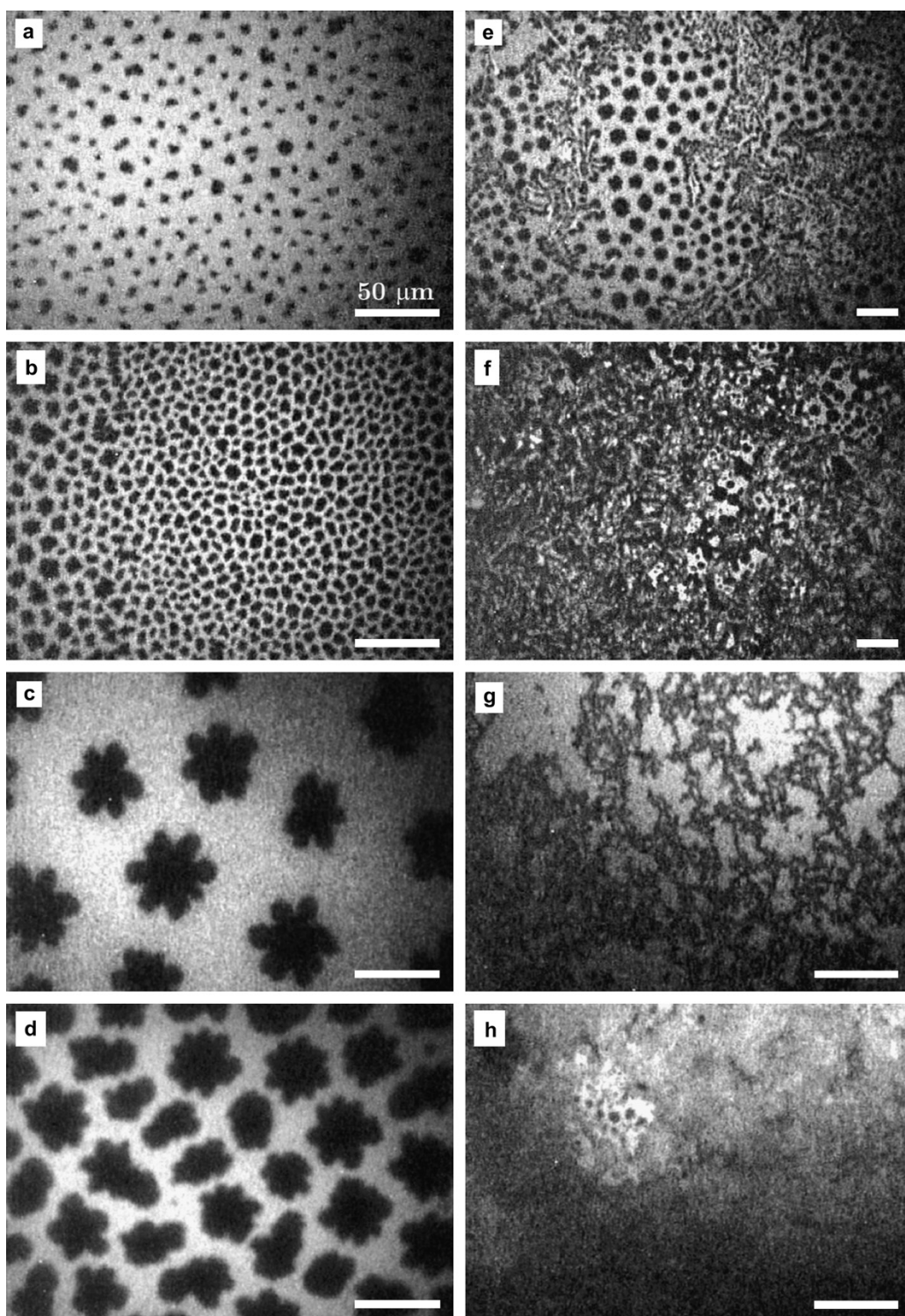


Figure 8.10. Fluorescence microscopy images: (a,b) monolayers of the hydrophilic part of the tear film synthetic replica at pressures 6.7 mN/m and 22.0 mN/m; (c,d) domain shapes for the same system obtained in a separate experiment under the same conditions at 11.2 mN/m and 18.5 mN/m; (e,f) surface layers of the full tear film synthetic replica at 27.0 mN/m and 40.9 mN/m; (g,h) surface layers of the natural tear film at 9.3 mN/m and 28.0 mN/m.



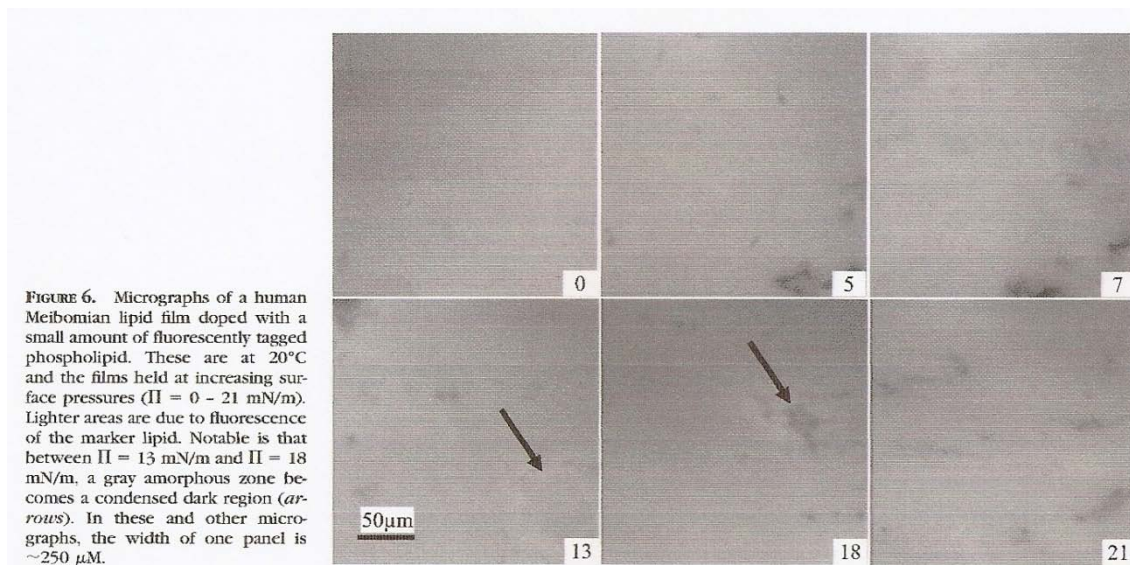
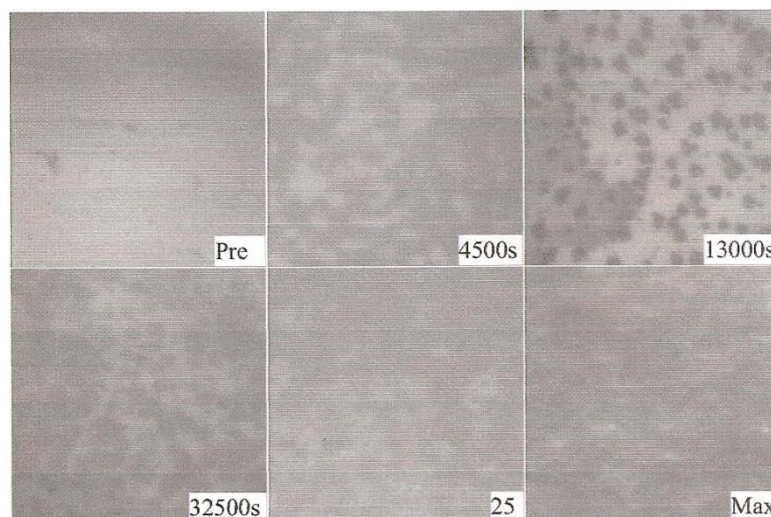


Figura 8.11



**FIGURE 8.** Penetration at 37°C of Tlc into a human Meibomian lipid film initially held at 10 mN/m. The micrographs show the appearance of the film before penetration (Pre) and at various times after penetration (4500 s, 13,000 s). After equilibrium was reached (32,500 s), the film was compressed and its appearance during ( $\Pi = 25$  mN/m) and at maximum compression ( $\Pi = 41$  mN/m) are shown.

Figura 8.12



Figuras 8.1-8.4

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 48 (2006) 128–137

Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomian lipid monolayer films

Poonam Mudgil, Margaux Torres, Thomas J. Millar

Figuras 8.5-8.9

Experimental Eye Research 86 (2008) 622-628

Adsorption of apo- and holo-tear lipocalin to a bovine Meibomian lipid film

Poonam Mudgil, Thomas J. Millar

Figura 8.10

Experimental Eye Research 84 (2007) 1140-1146

Two-dimensional order in mammalian pre-ocular tear film

P.G. Petrov, J.M. Thompson, I.B. Abdul Rahman, R.E. Ellis,

E.M. Green, F. Miano, C.P. Winlove

Figuras 8.11-8.12

Investigative Ophthalmology & Visual Science 50 (2009) 140

**Adsorption of Human Tear Lipocalin to Human Meibomian Lipid Films**

*Thomas J. Millar, Poonam Mudgil, Igor A. Butovich, and Chendur K. Palaniappan*